

Identification d'une mutation de JAK2 impliquée dans la Polyglobulie de Vaquez

5 La présente invention concerne le variant V617F de la protéine tyrosine kinase JAK2, ledit variant étant responsable de la Polyglobulie de Vaquez. L'invention se rapporte également à une méthode de diagnostic en première intention de l'érythrocytose et de la thrombocytose permettant de les rattacher à des syndromes myéloprolifératifs ou à la détection dans les syndromes myéloprolifératifs du variant JAK2 V617F permettant de 10 les reclasser dans un nouveau groupe nosologique et à l'identification d'inhibiteurs spécifiques et de siRNA.

La polyglobulie de Vaquez (Polycythemia Vera ou PV) est un syndrome myéloprolifératif chronique, associant une polyglobulie vraie et, souvent, une 15 thrombocytose et une hyperleucocytose. Il s'agit d'une maladie acquise, clonale, de la cellule souche hématopoïétique. Les progéniteurs hématopoïétiques de PV sont capables de former des colonies érythroblastiques en l'absence d'érythropoïétine (Epo), appelées « colonies spontanées ». Une hypersensibilité des progéniteurs érythroblastiques de PV à plusieurs autres facteurs de croissance a également été 20 démontrée : Interleukine-3 (IL-3), Granulocyte Macrophage-Stimulating Factor (GM-CSF), Stem Cell Factor (SCF), et Insuline Like Growth Factor (IGF-1). Plusieurs équipes se sont intéressées à la physiopathologie de la PV, mais l'anomalie moléculaire à l'origine de la maladie est restée inconnue à ce jour (H. Pahl, 2000).

25 L'hypersensibilité des progéniteurs de PV à plusieurs cytokines conduit à rechercher des anomalies touchant les voies de transduction du signal communes aux récepteurs aux cytokines. L'existence d'un marqueur moléculaire n'a jamais été mise en évidence dans la PV, mais étant données les similitudes entre la PV et les autres syndromes myéloprolifératifs, en particulier la LMC, il paraît probable que des mécanismes 30 moléculaires proches de ceux induits par Bcr-Abl soient responsables de l'avantage de prolifération du clone malin et de sa différenciation terminale. Cette hypothèse a été confirmée récemment dans deux syndromes myéloprolifératifs rares, les syndromes

BEST AVAILABLE COPY

myéloprolifératifs associés à une translocation impliquant la région chromosomique 8p11 qui induit une activation constitutive du récepteur du FGF et le syndrome hyperéosinophilique, dans lequel une délétion chromosomique cryptique aboutit à un gène chimérique PDGFR α -FIP1L1. Dans les deux cas, les anomalies moléculaires sont 5 à l'origine de protéines de fusion ayant une activité tyrosine kinase constitutive.

Dans la PV, il n'a pas été trouvé d'anomalie cytogénétique récurrente, même si une délétion 20q est détectée chez 10 à 15% des patients, et une perte d'hétérozygotie en 9p dans environ 30% des cas (Kralovics, 2002). Cependant, ces anomalies ne sont pas 10 spécifiques de la maladie.

Les cellules de PV présentant une indépendance à l'Epo, des recherches ont été entreprises sur la voie du récepteur de l'Epo (R-Epo). Tout d'abord, le récepteur est normal tant sur le plan structurel que fonctionnel (Hess et al., 1994; Le Couedic et al.; 15 Means et al., 1989). La phosphatase SHP-1 qui déphosphoryle R-Epo et JAK2 à l'arrêt de la stimulation par l'Epo, est normalement exprimée au niveau ARN et protéique (Andersson et al., 1997; Asimakopoulos et al., 1997). Plus en aval dans la signalisation de R-Epo, une activation anormale de STAT5 a été recherchée dans les polynucléaires (PNN) de patients présentant une PV sans retrouver d'anomalie. En 20 revanche, une phosphorylation constitutive de STAT3 a été mise en évidence dans les PNN de 4 cas de PV sur 14 étudiés (Roder, 2001). Enfin, l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-xl, cible transcriptionnelle de STAT5, a été étudiée en immunohistochimie et en cytométrie de flux (Silva et al., 1998). Il a ainsi été montré que bcl-xl était hyperexprimée dans les érythroblastes de PV et notamment à un stade 25 plus mature où cette protéine n'est normalement plus exprimée.

Dans la polyglobulie de Vaquez, les principaux critères diagnostiques sont à ce jour cliniques (critères du PVSG; Pearson, 2001). Le diagnostic biologique repose essentiellement sur la réalisation des cultures de progéniteurs érythroïdes en l'absence 30 d'Epo (déttection des colonies endogènes). En raison de l'expertise nécessaire à sa bonne réalisation, et l'importance du « temps-technicien » dépensé, cet examen n'est pas disponible dans tous les centres, et n'est fiable que lorsqu'il est réalisé par un

laboratoire expérimenté. De plus, le test nécessite d'être réalisé sur cellules médullaires prélevées sur le patient pour une bonne sensibilité, ce qui est n'est pas anodin pour le patient.

5 Par des techniques d'hybridation soustractive, une équipe allemande a cloné un gène hyperexprimé dans les PNN de PV, appelé PRV1 (Polycythemia Rubra Vera 1) (Temerinac et al., 2000). La protéine PRV-1 appartient à la superfamille des récepteurs de surface uPAR. L'hyperexpression de l'ARNm codant pour PRV-1 dans les polynucléaires de PV est facilement détectable par RT-PCR en temps réel, et constitue 10 un marqueur de la maladie de découverte récente, sans rôle physiopathologique. Cependant, les études récemment publiées montrent qu'il n'est ni très sensible ni très spécifique.

Spivak JL et al., en 2003 (« Chronic myeloproliferative disorders. » ; Hematology ; 15 2003;200 24.) décrit certains marqueurs de la PV. Les mRNA de l'antigène neutrophile NBI/CD177 sont surexprimés dans les granulocytes de patients PV. Ce marqueur ne semble toutefois pas un moyen fiable de détecter les PV, certains malades ne présentant pas cette surexpression ou cette surexpression pouvant être observée sur des sujets atteints de syndromes myéloprolifératifs autres que la Polyglobulie de Vaquez. Une 20 expression diminuée du récepteur à la thrombopoïétine, Mpl, sur les plaquettes est également retrouvée dans les PV. Bien que cette anomalie prédomine dans la PV, elle est retrouvée dans d'autres syndromes myéloprolifératifs. En outre, il s'agit d'un examen difficile à réaliser qui ne peut être effectué que dans des laboratoires spécialisés. Ainsi, il n'existe dans l'état de la technique aucune méthode permettant un diagnostic 25 fiable de la PV. En outre, les seuls traitements disponibles ne sont pas spécifiques. Il s'agit de saignées pour maintenir l'hématocrite dans les limites de la normale, ou l'emploi d'agents cytotoxiques, ou encore d'IFN.

Dans le cadre de la présente invention, nous avons non seulement découvert une 30 mutation dans le gène JAK2 dans environ 90% des patients testés mais nous avons également établi que cette mutation est responsable d'une activation constitutive de cette

tyrosine kinase et démontré que son inhibition permet de bloquer la prolifération et la différenciation spontanées des érythroblastes de PV.

JAK2 appartient à la famille des Janus Kinases (JAKs), qui regroupe plusieurs tyrosine kinases intracytoplasmiques : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les protéines JAK sont impliquées dans la signalisation intracellulaire de nombreux récepteurs membranaires qui n'ont pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, comme certains membres de la superfamille des récepteurs aux cytokines et en particulier le récepteur à l'Epo (R-Epo). La protéine JAK2 est codée par un gène qui comporte 23 exons. L'ADN complémentaire a une taille de 3500 paires de bases, et code pour une protéine de 1132 acides aminés (130 kD) (Figure 1). Nous avons identifié par PCR et séquençage une mutation ponctuelle acquise et clonale dans l'exon 12 de JAK2 chez près de 90 % des patients atteints de PV. Le codon 617 « GTC », codant normalement une Valine (V), est muté en « TTC », codant une Phénylalanine (F). Cette mutation V617F n'est pas retrouvée chez les 25 témoins ou patients atteints de polyglobulie secondaire testés. Par contre elle est retrouvée dans 40% des thrombocytémies essentielles et dans 50% des myéofibroses si bien que cette mutation définit un nouveau cadre de syndrome myéoprolifératif comme Bcr-Abl a défini la leucémie myéloïde chronique.

Pour étudier si le variant de l'invention JAK2 V617F pourrait être efficacement détecté avec des instruments largement répandus classiquement utilisés dans les laboratoires de diagnostic en hématologie, nous avons analysés 119 échantillons provenant de patients avec une suspicion de maladie myéoproliférative. Nous avons montré que JAK2 V617F était efficacement détectée par les technologies LightCycler® et TaqMan®, ces dernières étant un peu plus sensibles que le séquençage. Nous avons ensuite estimé la valeur de détection de JAK2 V617F en tant que test de diagnostic en première intention chez 88 patients avec des taux d'hématocrites supérieurs à 51%, et montré que la mutation correspondait au diagnostic de PV selon les critères WHO ($R = 0,879$) et PVSG ($R = 0,717$), avec une valeur prédictive positive de 100% dans le contexte de l'érythrocytose. Sur la base de ces données, nous proposons que la détection de JAK2 V617F dans les granulocytes soit considérée comme un test de diagnostic en première intention chez des patients avec une érythrocytose, évitant par conséquent la réalisation

d'une mesure de la masse de globules rouges, d'un aspirat de moelle osseuse et d'une analyse *in vitro* de la formation de colonies érythroïdes endogènes. Cette détection pourra aussi être étendue en première intention à l'ensemble des syndromes myéloprolifératifs ou à leur suspicion. Cette détection sera particulièrement importante

5 dans les thrombocytoses chroniques pour lesquelles il n'existe pas de tests biologiques certains pour affirmer un syndrome myéloprolifératif. Elle sera également un examen important dans le diagnostic des myéofibroses et devant des tableaux cliniques associées à des thromboses d'étiologie indéterminée.

10 Ainsi, l'invention apporte pour la première fois un outil de diagnostic et ouvre la voie au traitement ciblé de la PV et également des syndromes myéloprolifératifs associées à cette mutation. Plus spécifiquement, nous proposons la détection de la mutation JAK2 V617F en tant que test de diagnostic en première intention dans le cadre de l'érythrocytose, ce qui permet d'éviter la quantification de la masse de globules rouges et

15 des cellules endogènes érythroïdes (EEC) d'un aspirat de la moelle osseuse dans la majorité des patients et dans les thrombocytoses chroniques ce qui permettra d'éviter une longue enquête étiologique.

Description de l'invention

20 Ainsi, dans un premier aspect, la présente invention concerne la protéine isolée JAK2 (Janus kinase 2), en particulier la protéine Homo sapiens Janus kinase 2 (NCBI accession number NM_004972 ; GI:13325062), comprenant une mutation sur l'acide aminé 617 (codon 617 de l'ADNc à compter de l'ATG), plus particulièrement la

25 mutation V617F, ci-après dénommée variante JAK2 V617F, telle que présentée à la SEQ ID No 1 ci-dessous :

SEQ ID No 1 (V617F Homo sapiens Janus kinase 2 ou JAK2 V617F)

30 MGMACLTMTMEGTSTSSIYQNGDISGNANSMKQIDPVLQVYLYHSLGKSEAD
YLTFPSGEYVAEEICIAASKACGITPVYHNMFALMSETERIWYPPNHVFHIDEST
RHNVLYRIRFYFPRWYCSGSNRAYRHGISRGAEAPLDDFVMSYLFFAQWRHDF

VHGWIKVPTVTHETQEECLGMAVLDDMMRIAKENDQTPLAIYNSISYKTFPLKCIR
AKIQDYHILTRKRIRYRFRRFIQQFSQCKATARNLKLKYLINLETLQSAFYTEKF
EVKEPGSGPSGEEIFATIITGNGGIQWSRGKHKESETLTEQDLQLYCDFPNIIDVS
IKQANQEGSNESRVVTIHKQDGKNLEIELSSLREALSFVSLIDGYYRLTADAHY

5 LCKEVAPPAVLENIQSNCHGPISMDFAISKLKKAGNQTGLYVLRCSPKDFNKYF
LTFAVERENVIEYKHCLITKNENEYNSGTKNFSSLKDLLNCYQMETVRSDN
IIFQFTKCCPPKPKDKSNLLVFRNGVSDVPTSPTLQRPTHMNQMVFHKIRNEDL
IFNESLGQGTFTKIFKGVRREVGDYGQLHETEVLLKVLDKAHRNYESFSEAAS
MMSKLSHKHLVLNYGVCF⁶¹⁷CGDENILVQEFVKFGSLDTYLKKNKNCINILWK

10 LEVAKQLAWAMHFLEENTLIHGNVCAKNILLREEDRKTGNPPFIKLSDPGISIT
VLPKDILQERIPWVPPPECIENPKNLNLATDKWSFGTTLWEICSGGDKPLSALDSQ
RKLQFYEDRHQLPAPKWAELANLINNCMDYEPDFRPSFRAIIRDLNSLFTPDYE
LLTENDMLPNMRIGALGSGAFEDRDPTQFEERHLKFLQQLGKGNFGSVEMCR
YDPLQDNTGEVVAVKKLQHSTEELRDFEREIEILKSLQHDNIVKYKGVCYSAG

15 RRNLKLIMEYLPYGSRLDYLQKHKERIDHKLQYTSQICKGMEYLGTKRYIHR
DLATRNILVENENRVKIGDFGLTKVLPQDKEYYKVKEPGESPIFWYAPESLTES
KFSVASDVWSFGVVLYELFTYIEKSKSPPAEFMRMIGNDKQGQMIVFHLLIELLK
NNNGRLPRPDGCPDEIYMIMTECWNNNVNQRPSFRDLALRVDQIRDNMAG

20 L'invention vise également des équivalents de cette protéine mutée en position 617 chez d'autres mammifères, par exemple les JAK2 V617F chez d'autres mammifères tels que le rat (NM_031514), le porc, la souris (NM_008413),... ainsi que des variants de la SEQ ID No 1 qui comportent en outre une ou plusieurs modifications qui n'affectent pas l'activité et la structure 3D du variant.

25 L'invention porte également sur une séquence nucléotidique codant pour la SEQ ID No 1, de préférence la SEQ ID No 2 (séquence du gène humain JAK2 avec le codon TTC au lieu de GTC sur le codon 617 (**mutation g/t en position 1849**, si après dénommée par G1849T, à partir de l'ATG marquant le début de la traduction)).

30

Cette séquence peut se trouver dans un vecteur viral ou plasmidique ou encore un ADN nu sous le contrôle d'un promoteur efficace dans les cellules de mammifères. L'invention s'étend donc à un vecteur exprimant la protéine JAK2 V617F.

Le vecteur de l'invention peut être un vecteur de clonage et/ou d'expression et peut être 5 utilisé pour transfecter une cellule hôte, notamment une cellule de mammifère, de préférence une cellule progénitrice CD34⁺ humaine.

Animal transgénique modèle de la PV et autres syndromes myéloprolifératifs

10 L'invention porte également sur un animal transgénique non humain exprimant JAK2 V617F recombinante. Cet animal peut de préférence être une souris ou un rat. Les rats ou souris transgéniques servant de modèle peuvent être obtenus par toute méthode couramment utilisée par l'homme du métier, notamment un Knock-in (insertion ciblée d'une séquence) par recombinaison homologue ou recombinaison dirigée avec les 15 système Cre-LoxP ou FLP-FRT dans des cellules ES. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule transgénique selon l'invention est obtenue par ciblage génique (« gene targeting ») du variant JAK2 G1849T au niveau d'une ou des séquences du génome de la cellule hôte. Plus précisément, le transgène est inséré de manière stable par recombinaison homologue au niveau de séquences homologues dans 20 le génome de la cellule hôte. Lorsqu'il s'agit d'obtenir une cellule transgénique en vue de produire un animal transgénique, la cellule hôte est de préférence une cellule souche embryonnaire (cellule ES) (Thompson *et al.*, 1989). Le ciblage génique représente la modification dirigée d'un locus chromosomique par recombinaison homologue avec une séquence d'ADN exogène ayant une homologie de séquence avec la séquence 25 endogène ciblée. On distingue différents types de ciblage génétique. Ici, le ciblage génique peut être utilisé plus particulièrement pour remplacer le gène JAK2 sauvage par le gène variant JAK2 G1849T ou toute autre variant génétiquement similaire. Dans ce cas, le ciblage génique est appelé « Knock-in » (K-in). Alternativement, le ciblage génique peut être utilisé pour diminuer ou annihiler l'expression de JAK2 sauvage puis 30 pour introduire le gène du variant de JAK2. Il s'agit alors de ciblage génique appelé « Knock-Out » (KO) (voir Bolkey *et al.*, 1989). La cellule selon l'invention se caractérise en ce que le transgène est intégré de manière stable dans le génome de ladite

cellule, et en ce que son expression est contrôlée par les éléments de régulation du gène endogène. Par intégration de manière stable, on entend signifier l'insertion du transgène dans l'ADN génomique de la cellule selon l'invention. Le transgène ainsi inséré est ensuite transmis à la descendance cellulaire. L'intégration du transgène est réalisée en 5 amont, en aval ou au milieu du gène endogène cible JAK2. Facultativement, un ou plusieurs gènes de sélection positive ou négative peuvent être utilisés. On peut aussi utiliser des régions d'ADN d'homologie avec le locus cible, de préférence au nombre de deux, situé de part et d'autre de la portion du gène rapporteur ou de part et d'autres de la 10 séquence complète à insérer. Par « régions d'ADN d'homologies », on entend désigner deux séquences d'ADN qui, après un alignement optimal et après comparaison, sont identiques pour habituellement au moins environ 90% à 95% des nucléotides et, préférentiellement, au moins environ 98 à 99,5% des nucléotides. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA 15 et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Bien que aussi peu que 14 pb homologues à 100% soient suffisantes pour réaliser la recombinaison homologue dans les bactéries et les 20 cellules de mammifère, des portions de séquences homologues plus longues sont préférées (en général ces portions font au moins 2000 pb, de préférence au moins 5 000 pb pour chaque portion de séquence homologue. Avantageusement, la séquence JAK variant est insérée dans l'ensemble des éléments assurant une régulation du type 25 endogène, c'est-à-dire un ensemble comprenant au moins le promoteur, des séquences régulatrices (enhanceurs, silenceurs, insulateurs), les signaux de terminaison du gène JAK endogène.

Selon un mode de réalisation particulier, le transgène JAK G1849T comprend au moins 30 la séquence codante, une cassette de sélection positive encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinases, par exemple une cassette Lox/Néo-TK/Lox ou lox/Néo/lox ou FRT/Néo-TK/FRT ou FRT/Néo/FRT pouvant également être présente

en position 5' de ladite séquence, et caractérisé en ce qu'une cassette de sélection négative contenant par exemple le ou les gènes DTA et/ou TK est présente à au moins une des extrémités du transgène. Le transgène de la présente invention est de préférence dérivé directement d'une séquence d'ADN exogène présente naturellement dans une 5 cellule animale. Cette séquence d'ADN sous forme native peut être modifiée par exemple par insertion de sites de restriction nécessaires au clonage et/ou par insertion de sites de recombinaison site spécifiques (séquences lox et flp).

A cet effet, le variant JAK2 G1849T peut être cloné dans un vecteur de clonage qui 10 permet d'en assurer sa propagation dans une cellule hôte, et/ou facultativement dans un vecteur d'expression pour assurer l'expression du transgène. Les technologies de l'ADN recombinant utilisées pour la construction du vecteur de clonage et/ou d'expression selon l'invention sont connues de l'homme du métier. Les techniques standard sont utilisées pour le clonage, l'isolement de l'ADN, l'amplification, et la purification ; les 15 réactions enzymatiques impliquant l'ADN ligase, l'ADN polymérase, les endonucléases de restriction sont effectuées selon les recommandations du fabricant. Ces techniques et les autres sont généralement réalisées selon Sambrook *et al.*, 1989). Les vecteurs incluent des plasmides, les cosmides, les bactériophages, les rétrovirus et autres virus animaux, les chromosomes artificiels, tels les YAC, BAC, HAC et autres vecteurs 20 analogues.

Les méthodes pour générer des cellules transgéniques selon l'invention sont décrites dans Gordon *et al.*, 1989. Diverses techniques pour transfacter des cellules de mammifères ont été revues par Keon *et al.*, 1990. Le transgène selon l'invention, 25 facultativement compris dans un vecteur linéarisé ou non, ou sous la forme d'un fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau (US 4,873,191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation (Lo, 1983), le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG, polybrène, 30 DEAE-Dextran...), ou encore l'infection virale (Van der Putten *et al.*, 1985).

Lorsque les cellules ont été transformées par le transgène, elles peuvent être cultivées *in vitro* ou bien être utilisées pour produire des animaux transgéniques non humains. Après transformation, les cellules sont ensemencées sur une couche nourricière et/ou dans un milieu approprié. Les cellules contenant la construction peuvent être détectées en utilisant un milieu sélectif. Après un temps suffisant pour laisser les colonies pousser, celles-ci sont récupérées et analysées pour déterminer si un événement de recombinaison homologue et/ou une intégration de la construction se sont produits. Pour réaliser le criblage des clones susceptibles de satisfaire à la recombinaison homologue, des marqueurs positifs et négatifs, encore appelés gènes de sélection, peuvent être insérés dans le vecteur de recombinaison homologue. Différents systèmes de sélection des cellules ayant réalisé l'événement de recombinaison homologue ont été décrits (pour revue US 5 627 059). Ledit gène de sélection positive selon l'invention est de préférence choisi parmi les gènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les antibiotiques, on peut citer de manière non exhaustive la néomycine, la tétracycline, l'ampicilline, la kanamycine, la phléomycine, la bléomycine, l'hygromycine, le chloramphénicol, la carbénicilline, la généticine, la puromycine. Les gènes de résistance correspondants à ces antibiotiques sont connus de l'homme du métier ; à titre d'exemple, le gène de résistance à la néomycine rend les cellules résistantes à la présence de l'antibiotique G418 dans le milieu de culture. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène HisD, l'agent sélectif correspondant étant l'histidinol. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de la guanine-phosphoribosyl-transférase (GpT), l'agent sélectif correspondant étant la xanthine. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de l'hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase (HPRT), l'agent sélectif correspondant étant l'hypoxanthine. Les ou les marqueurs de sélection utilisés pour permettre d'identifier les événements de recombinaison homologue peuvent affecter par la suite l'expression génique, et peuvent être éliminés, si nécessaire, par la mise en œuvre de recombinases site spécifiques telle la recombinase Cre spécifique des sites Lox (Sauer, 1994 ; Rajewsky *et al.*, 1996; Sauer, 1998) ou FLP spécifique des sites FRT (Kilby *et al.*, 1993).

Les colonies positives, c'est-à-dire contenant des cellules dans lesquelles au moins un événement de recombinaison homologue s'est produit sont identifiées par une analyse par southern blotting et/ou par des techniques de PCR. Le taux d'expression, dans les cellules isolées ou les cellules de l'animal transgénique selon l'invention, de l'ARNm correspondant au transgène peut également être déterminé par des techniques comprenant l'analyse par northern blotting, l'analyse par hybridation *in situ*, par RT-PCR. Egalement les cellules ou tissus animaux exprimant le transgène peuvent être identifiés en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine rapporteuse. Les cellules positives peuvent ensuite être utilisées pour réaliser les manipulations sur l'embryon et notamment l'injection des cellules modifiées par recombinaison homologue dans les blastocystes.

Pour ce qui concerne la souris, les blastocystes sont obtenus à partir de femelles superovulées de 4 à 6 semaines. Les cellules sont trypsinées et les cellules modifiées sont injectées dans le blastocèle d'un blastocyste. Après l'injection, les blastocystes sont introduits dans la corne utérine de femelles pseudo-gestantes. On laisse ensuite les femelles aller jusqu'à leur terme et les portées résultantes sont analysées pour déterminer la présence de cellules mutantes possédant la construction. L'analyse d'un phénotype différent entre les cellules de l'embryon nouveau-né et les cellules du blastocyste ou des cellules ES permet de détecter les nouveau-nés chimériques. Les embryons chimériques sont ensuite élevés jusqu'à l'âge adulte. Les chimères ou animaux chimériques, sont des animaux dans lesquels seule une sous-population de cellules possède un génome altéré. Les animaux chimériques présentant le gène ou les gènes modifiés, sont en général croisés entre eux ou avec un animal de type sauvage afin d'obtenir une descendance hétérozygote ou homozygote. Les hétérozygotes mâles et femelles sont ensuite croisés pour générer des animaux homozygotes. A moins qu'il ne soit indiqué, l'animal transgénique non humain selon l'invention comprend des changements stables de la séquence nucléotidique des cellules de la lignée germinale.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule transgénique non humaine selon l'invention peut servir de cellule donneuse de noyau dans le cadre d'un transfert de noyau ou transfert nucléaire. Par transfert nucléaire, on entend désigner le transfert

de noyau d'une cellule vivante donneuse de vertébré, d'un organisme adulte ou au stade fœtal, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans des femelles porteuses 5 pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture. Différentes techniques de clonage nucléaire sont susceptibles d'être utilisées ; parmi celles-ci, il convient de citer de manière non exhaustive celles qui font l'objet des demandes de brevet WO 95 17500, WO 97/07668, WO 97 07669, WO 98 30683, WO 99 01163 et WO 99 37143.

10

Ainsi, l'invention s'étend également à un animal transgénique non humain comprenant une séquence recombinante codant pour JAK2 V617F. Ces animaux peuvent être homozygotes ou hétérozygotes (JAK2 V617F / JAK2 V617F ou JAK2 V617F / JAK2). Ces animaux reproduisent notamment la polyglobulie de Vaquez, mais également tout 15 syndrome myéloprolifératif induit par JAK2 V617F. Ils permettent donc de réaliser un criblage fonctionnel d'inhibiteurs de tyrosine kinase, notamment un criblage d'inhibiteurs spécifiques de JAK2 V617F.

Une autre alternative peut consister à injecter un vecteur viral (rétrovirus ou lentivirus ou autres) capable d'exprimer le variant JAK2 V617F dans des cellules souches 20 hématopoïétiques, des cellules progénitrices ou des cellules ES pour également réaliser des modèles de polyglobulie de Vaquez ou d'autres syndromes myéloprolifératifs.

Outils de diagnostic

25 Dans un troisième aspect, l'invention vise les outils de diagnostic permettant de détecter la présence ou l'absence de la mutation JAK2 V617F chez un mammifère atteint ou susceptible de présenter un syndrome myéloprolifératif, notamment chez les patients montrant une polyglobulie ou dont on suspecte qu'ils présentent les symptômes de la polyglobulie de Vaquez, des thrombocytémies et/ou des myéofibroses.

30

A ce titre, l'invention se rapporte aux amorces et sondes permettant de détecter la présence ou l'absence de la mutation dans la séquence SEQ ID No 2 décrite ci-dessus.

Plus particulièrement, l'invention a trait à un acide nucléique isolé ayant une séquence d'au moins 10, 12, 15, 20, 30, 40 ou encore 50 nucléotides consécutifs (par exemple de 10 à 30 nucléotides ou de 10 à 25 nucléotides) de l'exon 12 ou de la séquence SEQ ID No 3 ou 4 ci-dessous et comprenant le nucléotide muté t^{1849} , par exemple de 10 à 30 nucléotides.

SEQ ID No 3

10 ctcatatgaaccaaatgggtttcacaaaatcagaaatgaagattgataatggaaaggcctggccaaggcactttacaag
attttaaaggcgatcgaaagagaagttaggagactacggctcaactgcatacagaagttttaaaagtctggataaagcac
acagaaaactattcagagtcattttgaagcagcaagttatgatgagcaagtttcatacagcattggtttaattatggatgt
15 t^{1849} tctgtggagacgagaatattctgggtcaggagtttggatcactagatacatatctgaaaaagaataaaaatt
gtataaatatattatggaaacttgaagttgctaaacagttggcatggccatgcattttctagaagaaaacacccttattcatgg
atgtatgtgccaatattctgcattatcagagaagaagacaggaaatcctccattcatcaaacttagtgcattgt
cattagtattacagtttgccaaaggacatttcaggag

15

La séquence soulignée désigne un exemple de zones en amont ou en aval permettant le design de sondes ou d'amorces spécifiques de la mutation en position 1849 (SEQ ID No 4).

20 Exemple de différentes amorces et sondes préférées de l'invention :

SUR ADN, AMORCES DE PCR :

25 JAK2EXON12-PCRF SENS 5'-GGGTTTCCTCAGAACGTTGA-3' (54804-54823)
(SEQ ID No 5)
JAK2EXON12-PCRR ANTI-SENS 5'-TTGCTTCCCTTTCACAGA-3' (55240-
55260) (SEQ ID No 6)

SUR ADN, AMORCES DE SEQUENÇAGE :

30 JAK2EXON12SEQF SENS 5'-CAGAACGTTGATGGCAGTTG-3' (54813-54832)
(SEQ ID No 7)

JAK2EXON12SEQR ANTI-SENS 5'-TGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTT-3'
(55207-55233) (SEQ ID No 8)

SUR CDNA, AMORCES DE PCR ET SEQUENÇAGE :

5 SENS 5'-CAACCTCAGTGGGACAAAGAA-3' (1386-1407) (SEQ ID No 9)
ANTI-SENS 5'-GCAGAATATTTGGCACATACA-3' (2019-2041) (SEQ ID No 10)

SONDES SNPs ET DETECTION DE MUTATION ET SIRNA (1829-1870) :

TTTTAAATTATGGAGTATGTGTCTGTGGAGACGAGAATATTC (SEQ ID No 11)

10

GENOTYPAGE sur LightCycler (ADN de PNN ou de moelle)

Oligo "S" (sens) GGCAGAGAGAATTCTGAAC (SEQ ID No 15)
Oligo "R" (antisens) GCTTCCTTTTCACAAGATA (SEQ ID No 16)

15

Sensor wt GTCTCCACAGACACATACTCCATAA 3'-FL (SEQ ID No 17)

Anchor JAK2 5' - LC Red640AAAACCAAATGCTTGTGAGAAAGCT 3' - PH
(SEQ ID No 18)

20 **GENOTYPAGE sur LightCycler (par exemple cDNA de plaquettes)**

cJAK2F GCACACAGAAACTATTCAAGAGTC (SEQ ID No 19)
cJAK2S AGCAGCAAGTATGATGAGC (SEQ ID No 20)
cJAK2A CTAGTGATCCAAATTTCACAAACT (SEQ ID No 21)
cJAK2R GTTAGCAACTTCAAGTTCC (SEQ ID No 22)

25

Sensor wt GTCTCCACAGACACATACTCCATAA3'-FL (SEQ ID No 23)
Anchor JAK2 5' - LC Red640AAAACCAAATGCTTGTGAGAAAGCT3' - PH
(SEQ ID No 24)

30 **GENOTYPAGE par la technologie Taqman (par exemple sur ADN de cellules mononucléaires de Moelle Osseuse).**

Reconnaissance par des sondes fluorescentes spécifiques d'allèle et ADN simple brin.

Réaction de PCR

Sequence primer sens : AAGCTTTCTCACAAAGCATTGGTTT (SEQ ID No 25)

Sequence primer antisens : AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT (SEQ ID No 5 26)

Reporter 1 Sequence (VIC) : TCTCCACAGACACATAC (SEQ ID No 27)

Reporter 2 Sequence (FAM) : TCCACAGAAACATAC (SEQ ID No 28)

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à une méthode de diagnostic *in vitro* ou *ex 10 vivo* permettant de détecter la présence ou l'absence de mutation JAK2 V617F dans un échantillon.

Tests avec les acides nucléiques de l'invention

15 Dans un premier mode de réalisation, le variant G1849T (correspondant à la mutation JAK2 V617F) peut être détecté par analyse de la molécule d'acide nucléique du gène JAK2. Dans le cadre de la présente invention, on entend par « acide nucléique » un ARNm, l'ADN génomique ou l'ADNc dérivé de l'ARNm.

20 La présence ou l'absence de l'acide nucléique du variant G1849T peut être détecté par séquençage, amplification et/ou hybridation avec une sonde et des amorces spécifiques, telles que décrites ci-dessus : séquence dérivée des SEQ ID No 3 ou 4 et SEQ ID No 5 à 11 ou encore SEQ ID No 15 à 24.

25 L'invention propose donc une méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour déterminer la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans un échantillon d'un patient atteint de PV ou susceptible de développer une PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif, notamment de l'éthrocytose, des thrombocytémies et myélofibroses, comprenant :

- a) l'obtention d'un échantillon d'acide nucléique du patient,
- 30 b) la détection de la présence ou de l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans ledit échantillon d'acide nucléique,

caractérisée en ce que la présence du variant G1849T est une indication de PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.

5 L'échantillon d'acide nucléique peut être obtenu à partir de n'importe quelle source cellulaire ou biopsie de tissu. Ces cellules doivent être d'origine hématopoïétique et peuvent être obtenus à partir de sang circulant, de tissu hématopoïétique ou tout fluide contaminé en cellules sanguines. L'ADN peut être extrait en utilisant toute méthode connue de l'état de la technique, telles que les méthodes décrites dans Sambrook et al. (1989). L'ARN peut également être isolé, par exemple à partir de tissus obtenus lors 10 d'une biopsie, en utilisant des méthodes standard bien connues de l'homme du métier, telles que l'extraction par le guanidiumthiophénate-phénol-chlorophorme.

15 Le variant G1849T du gène JAK2 peut être détecté dans un échantillon d'ARN ou d'ADN, de préférence après amplification. Par exemple, l'ARN isolé peut être soumis à une transcription-réverse puis une amplification, telles qu'une réaction RT-PCR en utilisant les oligonucléotides spécifiques du site muté ou qui permettent l'amplification de la région contenant la mutation, par exemple l'exon 12 ou la séquence SEQ ID No 3 ou 4. L'expression « oligonucléotide » est utilisée ici pour désigner un acide nucléique d'au moins 10, de préférence entre 15 et 25 nucléotides, de préférence inférieur à 100 20 nucléotides, et qui est capable de s'hybrider à l'ADN génomique de JAK2, à l'ADNc ou encore à l'ARNm.

25 Les oligonucléotides de l'invention peuvent être marqués selon toute technique connue par l'homme du métier, tels que des marqueurs radioactifs, fluorescents ou enzymatiques. Un oligonucléotide marqué peut être utilisé comme sonde pour détecter la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2.

Ainsi, les sondes et amorces utiles selon l'invention sont celles qui s'hybrident spécifiquement à la région du gène JAK2 à proximité du nucléotide en position 1849 30 (numérotation à partir de l'ATG marquant le début de la transcription).

Dans la méthode explicitée ci-dessus, les acides nucléiques peuvent être amplifiés par PCR avant la détection de la variation allélique. Les méthodes pour la détection de la variation allélique sont décrites par exemple dans « Molecular Cloning - A Laboratory Manual » Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor 5 Laboratory, 1989) et Laboratory Protocols for Mutation Detection, Ed. par U. Landegren, Oxford University Press, 1996 et PCR, 2ème édition par Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

A ce titre, il est possible de combiner une étape d'amplification suivie par une étape de 10 détection permettant de discriminer les échantillons en fonction de la présence ou de l'absence du variant recherché.

Différentes techniques adaptées à cet effet sont présentées dans EP 1 186 672, telles que le séquençage d'ADN, le séquençage par hybridation SSCP, DGGE, TGGE, l'analyse 15 hétéroduplex, CMC, le clivage enzymatique de mésappariements, « hybridization based solid phase hybridization », les puces à ADN (DNA Chips), solution phase hybridization Taqman™ (US 5 210 015 et US 5 487 972) », ainsi que la technique RFLP.

20 La détection peut être réalisée en utilisant différentes méthodes alternatives : FRET, fluorescence quenching, fluorescence polarisée, chimiluminescence, électrochimiluminescence, radioactivité et méthode colorimétrique.

La méthode selon l'invention peut inclure ou exclure les étapes consistant à obtenir 25 l'échantillon et à extraire l'acide nucléique dudit échantillon.

Comme indiqué ci-dessus, l'échantillon utilisé peut être du sang ou tout autre fluide corporel ou tissu obtenu d'un individu. Après les étapes d'extraction et de purification de l'acide nucléique, l'amplification PCR au moyen des amorces décrites ci-dessus peut 30 être utilisée pour améliorer la détection du signal.

Ainsi, la méthode selon l'invention peut comprendre l'étape d'amplification au moyen desdites amorce, suivie par une étape d'hybridation avec au moins une sonde, de préférence deux sondes qui s'hybrident en condition de forte stringence aux séquences correspondant à la région de la mutation G1849T mentionnée ci-dessus et la détection 5 du signal produit par les marqueurs desdites sondes.

Par exemple, l'invention vise plus particulièrement une méthode *in vitro* pour déterminer la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans un échantillon d'un patient atteint de PV ou susceptible de développer une PV ou tout autre 10 syndrome myéloprolifératif comprenant la détection de la présence ou de l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans ledit échantillon d'acide nucléique au moyen d'un ou plusieurs SNP (Single nucleotide polymorphism) spécifique de la mutation G1849T du gène JAK2, notamment les SEQ ID No 17, 18 ou encore 23 et 24; caractérisée en ce que la présence du variant G1849T est une indication de PV ou de 15 tout autre syndrome myéloprolifératif.

Cette détection au moyen de SNPs peut être mise en œuvre par la Technologie TaqMan® permettant une discrimination allélique. Essentiellement, cette méthode consiste en la reconnaissance par des sondes fluorescentes spécifiques de l'allèle 1849 20 de JAK2 sur ADN simple brin et comprend une réaction PCR (avec une polymérase à activité 5' exonucléasique), la détection de l'émission de fluorescence spécifique d'allèle des SNP hybridés, la détermination du génotype par lecture de la fluorescence en point final (obtention d'une image montrant les clusters d'ADN muté homozygote, hétérozygote et normal).

25

Détection de la protéine mutée JAK2 V617F

Selon un autre mode de réalisation, le variant peut être détecté directement au sein de la 30 protéine JAK2.

A cet effet, l'invention vise une méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon d'un patient atteint ou susceptible de développer la PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif, notamment de l'érythrocytose, des thrombocytémies et myélofibroses, comprenant :

- 5 a) l'obtention d'un échantillon du patient,
- b) la détection de la présence ou de l'absence du variant JAK2 V617F, caractérisée en ce que la présence dudit variant est une indication de la PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.

10 Ledit variant JAK2 V617F peut être détecté par toute méthode appropriée connue de l'état de la technique.

Plus particulièrement, un échantillon, obtenu d'un individu, peut être mis en contact avec un anticorps spécifique du variant V617F de la protéine JAK2, par exemple un 15 anticorps qui est capable de faire la distinction entre le variant V617F et la protéine JAK2 non mutée (et de tout autre protéine).

Les anticorps de la présente invention peuvent être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, simple chaîne ou double chaîne, des anticorps chimériques, humanisés ou 20 des portions de molécules d'immunoglobuline comprenant les portions connues de l'état de la technique comme correspondant aux fragments de liaison à l'antigène [fragment humain, humain, F(ab')2 et F(v)].

25 Ces anticorps peuvent être immunoconjugués, par exemple avec une toxine ou un marqueur.

Les protocoles pour l'obtention d'anticorps polyclonaux sont bien connus de l'homme du métier. Typiquement, de tels anticorps peuvent être obtenus par l'administration du variant JAK2 V617F par injection souscutanée à des lapins blancs de Nouvelle-Zélande 30 qui ont préalablement été préparés pour obtenir un sérum pré-immunitaire. Les antigènes peuvent être injectés jusqu'à 100 µl par site à 6 différents sites. Les lapins sont préparés deux semaines avant la première injection puis périodiquement stimulés

par le même antigène, environ trois fois toutes les six semaines. Un échantillon de sérum est alors obtenu dix jours après chaque injection. Les anticorps polyclonaux sont ensuite purifiés du sérum par chromatographie d'affinité en utilisant la protéine JAK2 V617F pour capturer les anticorps.

5

Les anticorps monoclonaux sont préférés aux anticorps polyclonaux à cause de leur haute spécificité.

L'obtention de tels anticorps monoclonaux est à la portée de l'homme du métier, sachant que le variant JAK2 V617F présente une structure 3D différente de la protéine 10 JAK2 sauvage. L'expression « anticorps monoclonal » signifie un anticorps qui est capable de reconnaître seulement un épitope d'un antigène.

Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés par immunisation d'un mammifère, par exemple une souris, un rat, ou d'autres mammifères avec le variant JAK2 V617F purifié. Les cellules du mammifère immunisé produisant les anticorps sont isolées et 15 fusionnées avec des cellules de myélomes ou d'hétéro-myélomes pour produire des cellules hybrides (hybridomes).

Les cellules d'hybridomes produisant l'anticorps monoclonal sont utilisées comme 20 sources pour la production de l'anticorps. Les techniques de génération d'anticorps n'impliquant pas une immunisation sont également visées par l'invention. Il s'agit par exemple de la technologie « phage display ».

Les anticorps dirigés contre le variant JAK2 V617F peuvent dans certains cas présenter une réaction croisée avec la protéine JAK2 sauvage. Si tel est le cas, une sélection des 25 anticorps spécifiques du variant V617F est nécessaire. A ce titre, on peut utiliser par exemple une chromatographie d'affinité avec la protéine JAK2 sauvage pour capturer les anticorps qui présenterait une réaction croisée avec JAK2 sauvage.

Ainsi, l'invention vise un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le variant 30 JAK2 V617F ainsi que les lignées d'hybridomes le produisant.

L'invention porte également sur un test ELISA au moyen dudit anticorps pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon.

Une alternative à l'utilisation des anticorps peut consister par exemple à la préparation et l'identification d'haptamères qui sont des classes de molécules permettant une reconnaissance moléculaire spécifique.

5 Les haptamères sont des oligonucléotides ou des oligopeptides qui peuvent virtuellement reconnaître n'importe quelle classe de molécules cibles avec une haute affinité et spécificité.

Kits

10

Dans un autre aspect, l'invention concerne des kits pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F.

15

Le kit de l'invention peut comprendre une ou plusieurs sondes ou amorces telles que définies ci-dessus pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

20

Le kit peut également comprendre une polymérase thermorésistante pour l'amplification PCR, une ou plusieurs solutions pour l'amplification et/ou l'étape d'hybridation, ainsi que tout réactif permettant la détection du marqueur.

Dans un autre mode de réalisation, le kit comprend un anticorps tel que défini ci-dessus.

25

Les kits de l'invention peuvent contenir en outre tout réactif adapté à l'hybridation ou à la réaction immunologique sur support solide.

30

La méthode et le kit de détection sont avantageusement pratiqués pour la sous-population de patients présentant un taux d'hématocrites supérieur à 51%. La méthode et le kit de détection sont également avantageusement pratiqués pour la sous-population de patients présentant un taux de plaquettes supérieur à 450 000.

siRNA de l'invention

Dans un quatrième aspect, l'invention porte également sur des siRNA permettant de diminuer de plus de 50%, 75%, 90% ou 95% ou encore de plus de 99% l'expression de 5 JAK2 mutée en position 617, en particulier de JAK2 V617F. Ces siRNA peuvent être injectés dans les cellules ou tissus par lipofection, transduction, ou électroporation. Ils permettent de détruire spécifiquement les ARNm codant pour JAK2 V617F impliquant de nombreuses applications thérapeutiques possibles, notamment le traitement de la polyglobulie de Vaquez.

10 Des siRNA sont décrits dans US 60/068562 (CARNEGIE). L'ARN est caractérisé en ce qu'il possède une région avec une structure double brin (db). L'inhibition est spécifique de la séquence cible, la séquence nucléotidique d'un brin de la région db de l'ARN comprenant au moins 25 bases et étant identique à la portion du gène cible. La séquence 15 nucléotidique de l'autre brin de la région db de l'ARN est complémentaire à celle du premier brin et à la portion du gène cible. Par ailleurs, la demande WO 02/44 321 (MIT/MAX PLANCK INSTITUTE) décrit un ARN double brin (ou des oligonucléotides de même nature synthétisés chimiquement) dont chaque brin a une longueur de 19 à 25 nucléotides et qui est capable d'inhiber spécifiquement l'expression 20 post transcriptionnelle d'un gène cible par un processus d'interférence ARN afin de déterminer la fonction d'un gène et afin de moduler cette fonction dans une cellule ou un organisme. Enfin, WO 00/44895 (RIBOPHARMA) porte sur un procédé d'inhibition de l'expression d'un gène cible donné dans une cellule eucaryote *in vitro*, dans lequel un ARNdb formé de deux ARN simples brins séparés est introduit dans la cellule, un 25 brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire du gène cible caractérisé en ce que la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives. L'homme du métier pourra se référer à l'enseignement contenu dans ces documents pour la préparation des siRNA de la présente invention.

30 Plus spécifiquement, l'invention porte sur des ARN double brin d'environ 15 à 30 nucléotides, 19 à 25 nucléotides, ou de préférence environ 19 nucléotides de long complémentaires (brin 1) et identiques (brin 2) à la séquence SEQ ID No 3 comprenant

la mutation G1849T. Ces siRNA de l'invention peuvent comporter en outre un dinucléotide TT ou UU à l'extrémité 3'.

De nombreux programmes sont disponibles pour le design des siRNA de l'invention:

- « siSearch Program » à http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.6.html
- 5 (« Improved and automated prediction of effective siRNA », Chalk AM, Wahlesdelt C, and Sonnhammer ELL, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004).
- « SiDirect » à <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php> (Direct: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference, Yuki Naito et al, 10 Nucleic Acids Res, Vol. 32, No. Web Server issue © Oxford University Press 2004).

- « siRNA Target Finder » de Ambion à l'adresse

http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_tools.html

- Le « siRNA design tool » du Whitehead Institute of Biomedical Research au MIT à l'adresse <http://jura.wi.mit.edu/pubint/http://iona.wi.mit.edu/siRNAtext/>

15 D'autres programmes sont listés à :

<http://web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2files/siRNAs.htm>,

notamment http://athena.bioc.uvic.ca/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=sirna

Par exemple, pour la séquence TATGGAGTATGTT¹⁸⁴⁹TCTGTGGAGA (SEQ ID No 12), le siRNA sens est UGGAGUAUGUUUCUGUGGAdTdT (SEQ ID No 13) et le 20 siRNA antisens est UCCACAGAAACAUACUCCAdTdT (SEQ ID No 14).

Dans un mode de réalisation particulier, les siRNA de l'invention décrits ci-dessus sont testés et sélectionnés pour leur capacité à réduire, voir bloquer spécifiquement l'expression de JAK2 V617F en affectant le moins possible l'expression de JAK2 sauvage. Par exemple, l'invention vise des siRNA permettant une diminution supérieure 25 à 80%, 90%, 95% ou 99 % de l'expression de JAK2 V617F et aucune diminution ou une diminution inférieure à 50%, 25%, 15%, 10% ou 5% ou encore inférieure à 1% de JAK2 sauvage.

Par exemple, les siRNA de l'invention peuvent être sélectionnés dans le groupe 30 constitué de:

- UGGAGUAUGUUUCUGUGGA (SEQ ID No 29)
- GGAGUAUGUUUCUGUGGAG (SEQ ID No 30)

- GAGUAUGUUUCUGUGGAGA (SEQ ID No 31)

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne une molécule ddRNAi telle que décrite de manière générique dans la demande WO 01/70949 (Benitec) mais ciblant 5 spécifiquement JAK2 V617F. Le ddRNAi de l'invention permet l'extinction de la séquence codant pour JAK2 V617F et comprend (i) une séquence identique à la SEQ ID No 3, 4 ou 11 ; (ii) une séquence complémentaire à la séquence défini en (i) ; (iii) un intron séparant lesdites séquences (i) et (ii) ; l'introduction de cette construction dans une cellule ou un tissu produisant un ARN capable d'altérer l'expression de JAK2 10 V617F.

L'invention porte également sur un animal non humain génétiquement modifié comprenant une ou plusieurs cellules contenant une construction génétique capable de bloquer, de retarder ou de réduire l'expression de JAK2 V617F dans l'animal. La méthode de production d'un tel animal génétiquement modifié est présentée dans WO 15 04/022748 (Benitec).

Méthodes de criblage

Dans un cinquième aspect, l'invention a pour objet une méthode de criblage 20 d'inhibiteurs spécifiques de JAK2 V617F.

Par « inhibiteurs spécifiques », on entend désigner des composés présentant un ratio IC50 sur JAK2 / IC50 sur JAK2 V617F supérieur à 5, 10, 25, ou encore 50. Par exemple, le composé possède une IC50 JAK2 V617F inférieure à 1 μ M, de préférence 25 100 nM alors qu'il possède une IC50 JAK2 supérieure à 5 μ M ou 10 μ M.

Cette méthode peut être mise en œuvre à l'aide de la protéine de l'invention, d'une fraction membranaire comprenant ladite protéine, d'une cellule exprimant ladite protéine ou encore d'un animal transgénique non humain tel que décrit plus haut.

30

Ainsi, l'invention porte sur un test permettant de déterminer l'inhibition spécifique de JAK2 V617F par un ou plusieurs composés comprenant les étapes consistant à mettre

en contact un ou plusieurs composés avec la protéine JAK2 V617F décrite ci-dessus, une fraction membranaire comprenant JAK2 V617F ou encore une cellule exprimant JAK2 V617F décrite ci-dessus dans des conditions appropriées pour une fixation et une détection de la fixation spécifique et/ou de l'inhibition de JAK2 V617F.

5 Ce procédé peut comprendre en outre une mesure de la fixation sur JAK2 sauvage. Ce procédé peut également consister en une succession de tests de plusieurs molécules et comprendre une étape de sélection des molécules présentant une IC50 pour JAK2 V617F inférieure à 1 μ M, de préférence 100 nM. Ce procédé peut comprendre en outre une étape de sélection négative des molécules 10 mentionnées ci-dessus qui possèdent une IC50 pour JAK2 inférieure à 5 μ M ou 1 μ M.

L'invention porte sur un criblage *in vitro* tel que décrit ci-dessus dans lequel on détermine par immunoprécipitation l'inhibition de la phosphorylation de JAK2 V617F.

15 L'invention porte également sur un criblage *in vivo* sur des cellules progénitrices CD34+ JAK2 V617F qui sont capables de se différencier sans érythropoïétine (Epo). De telles cellules isolées de patients atteints de la polyglobulie de Vaquez. Les cellules CD34+ JAK2 V617F peuvent être mises en culture dans un milieu comprenant du SCF et IL-3. Les composés sont rajoutés dans le milieu de culture et on détermine la capacité des 20 cellules à proliférer et à se différencier en cellules 36+/GPA-. On sélectionne les composés pour lesquels une diminution du nombre de clones 36+/GPA- est observée. Ainsi, l'invention porte sur la méthode de criblage ci-dessus au moyen de cellules primaires progénitrices CD34+ JAK2 V617F qui sont capables de se différencier sans érythropoïétine (Epo) ou sur des lignées cellulaires devenues facteur indépendantes par 25 introduction du variant JAK2 V617F. Le même type d'essai peut être réalisé sur des cultures de moelle de type CFU-E en milieu semi-solide et testé directement le composé sur l'inhibition de la croissance spontanée des colonies.

On peut également utiliser toute lignée cellulaire de mammifère décrite ci-dessus exprimant JAK2 V617F recombinante.

30 L'invention porte également sur une méthode pour l'identification de candidats médicaments comprenant les étapes consistant à administrer des composés à un animal

transgénique non humain exprimant JAK2 V617F tel que décrit plus haut, ledit animal reproduisant la polyglobulie de Vaquez et/ou étant atteint d'un syndrome myéloprolifératif associé à la présence de JAK2 V617F, à déterminer l'effet du composé et sélectionner les candidats médicaments pour lesquels on observe une diminution ou 5 un blocage de la prolifération et de la différenciation spontanées des érythroblastes de polyglobulie de Vaquez ou une diminution de la prolifération cellulaire associé à la présence de JAK2 V617F.

Plus particulièrement, cette méthode est réalisée avec une souris K-in JAK2 V617F ou 10 un rat K-in JAK2 V617F tel que décrit ci-dessus.

Parmi ces composés, on peut citer par exemple les siRNA ciblant l'exon 12 muté de JAK2 mentionnés ci-dessus, en particulier des siRNA ciblant la séquence SEQ ID No 3, 15 4 ou encore la séquence SEQ ID No 11 comprenant le nucléotide muté t¹⁸⁴⁹.

Un autre aspect de l'invention porte sur l'utilisation desdits SiRNA ou ddRNAi décrits ci-dessus, et des composés inhibant spécifiquement JAK2 V617F pour la fabrication d'un médicament. Ledit médicament est notamment destiné au traitement des cancer du sang, en particulier les syndromes myéloprolifératifs comprenant la Polyglobulie de 20 Vaquez, la thrombocythénie essentielle, la splénomégalie myéloïde ou myéofibrose primitive et la leucémie myéloïde chronique (LMC). Ledit médicament est également destiné au traitement d'autres hémopathies malignes; associées à la mutation JAK2 V617F, et le cas échéant des tumeurs solides, des carcinomes, des mélanomes et des neuroblastomes, qui expriment JAK2 V617F.

25 Pour la suite de la description et pour les exemples, on se référera aux figures dont la légende est indiquée ci-dessous.

Légendes

30 **Figure 1 : Découverte du rôle clé de JAK2 dans la PV**

À l'état basal, JAK2 est fixé sur la box 1 à l'état non phosphorylé. La liaison à l'EPO modifie la conformation du récepteur et permet la transphosphorylation de JAK2 qui en retour phosphoryle les résidus intracytoplasmiques de EPO-R et recrute ainsi les différents effecteurs positifs (->) ou négatifs (- |) de la transduction du signal.

5 **Figure 2 : Mise au point d'un modèle de culture de progéniteurs CD34+ de PV qui peuvent se différencier sans érythropoïétine.**

2A- culture avec Epo, SCF et IL-3

2B- culture sans Epo.

10 **Figure 3 : L'inhibition des voies JAK-STAT, Pi3-K et Src kinase empêche la différenciation érythroïde spontanée.**

Figure 4 : Protocole d'inhibition de JAK2 dans les progéniteurs de PV.

Figure 5 : Résultats de l'inhibition de JAK2 dans les progéniteurs de PV.

5A- Diminution de la capacité de clonage des 36+/gpa- Culture J1-J6 en SCF-IL3, électroporation J5 tri J6 (morpho/36+/gpa-).

15 Méthyl SCF seul. Compte à J13 (J7 post tri)

5B- Structure de JAK2 avec la mutation V617F (exon 12)

Figure 6 : Analyses de génotypage des SNP pour détecter la mutation JAK2 V617F dans l'ADN génomique avec les technologies LightCycler® et TaqMan®

20 A et B : Détection de la mutation par la courbe d'analyse de fusion de LightCycler® avec les sondes d'hybridation FRET. A : Des expériences avec diverses dilutions d'ADN HEL dans de l'ADN TF-1 sont représentées. Le pic JAK2 V617F (57°) est encore détectable à une dilution de 1%. B : Des résultats provenant d'échantillons de patients représentatifs sont représentés (#1 : homozygote ; #2 : hétérozygote ; #3 : faible ; #4 : non muté).

25 C : Détection de la mutation par amplification spécifique d'allèle TaqMan®. Des expériences de dilution d'ADN HEL (HEL de 100 à 1% : carrés vides ; cellules TF-1 : cercles vides) et quelques échantillons de patients représentatifs sont représentés (croix noires). #a : patients homozygotes ; #b : patients hétérozygotes ; #c : patient faible ; #d : patients non mutés.

30 **Figure 7 : Fiche de diagnostic proposée pour le diagnostic d'une érythrocytose (c'est-à-dire un taux d'hématocrites supérieur à 51%).**

Le nombre de patients concernés à chaque étape de la fiche est écrit à côté de chaque article (n), seuls les patients ayant eu toutes les données cliniques étant listés ici (n = 81). La détection de JAK2 V617F en tant que test de diagnostic en première intention aurait évité à 58/81 patients d'avoir d'autres investigations pour diagnostiquer un 5 syndrome myéloprolifératif de type PV.

Figures 8 et 9 : L'expression de V617F Jak2 dans des cellules HEL est diminuée 24 heures après le traitement au siRNA spécifique de JAK2 V617F Jak2 (siRNA #1, 3 et 4).

0 à 6 : Cellules HEL traitées (1 à 6) ou non traitées (0) avec les siRNA V617F Jak2.

10 C+ : Cellules 293HEK transfectées avec le vecteur V617F Jak2 RV.

C- : 293HEK.

Figure 10 : Le niveau d'expression de WT Jak2 dans des cellules K562 n'est pas changé 24 heures après un traitement au siRNA spécifique de Jak2 V617.

Je : Cellules K562 traitées avec les siRNA WT Jak2.

15 0 à 6 : Cellules K562 traitées avec les siRNA V617F Jak2.

C- : 293HEK (pas d'expression de JAK2).

Exemple 1: Identification de la mutation JAK2 V617F dans 39/43 patients.

20 La mise au point d'un modèle de culture cellulaire des progéniteurs pathologiques et l'utilisation d'inhibiteurs biochimiques nous a permis d'établir que les voies JAK2-STAT5, PI3 kinase, et Src kinases sont nécessaires à la différenciation indépendante de l'Epo des progéniteurs de PV (Ugo et al, 2004). Ces résultats nous ont conforté dans notre hypothèse selon laquelle la lésion moléculaire primaire à l'origine de la PV devait 25 être une anomalie d'une protéine clef aboutissant à la dérégulation d'une voie de signalisation, comme une mutation d'une tyrosine kinase lui conférant une activité constitutive. Néanmoins, c'est l'étude de 43 patients atteints de la polyglobulie de Vaquez qui a permis d'identifier le rôle clé de la protéine JAK2, qui est la protéine située le plus en amont dans ces différentes voies de signalisation, et qui est commune 30 aux voies de signalisation des récepteurs aux cytokines pour lesquelles des anomalies de réponse ont été décrites dans la PV. Nous avons étudié l'implication de la protéine kinase JAK2 dans la physiopathologie de la PV par 3 abords complémentaires :

- un abord fonctionnel (inhibition de JAK2 dans les cellules de PV par ARN interférence),
- un abord génomique (séquençage des 23 exons du gène), et
- un abord biochimique à la recherche d'une anomalie de phosphorylation de JAK2 à 5 l'origine d'une activation constitutive.

Le matériel biologique utilisé provient de patients consentants atteints de polyglobulie et correspond aux résidus de prélèvements réalisés à visée diagnostique adressés au Laboratoire Central d'Hématologie de l'Hotel Dieu, et à des saignées thérapeutiques.

10 1.1 Etude fonctionnelle

L'étude de la fonction de JAK2 dans les érythroblastes de patients atteints de polyglobulie de Vaquez a été réalisée en transdisutant par électroporation des érythroblastes de PV avec un siRNA spécifique de la séquence JAK2 (AMBION, Huntingdon, Angleterre) reconnaissant comme cible une séquence située sur l'exon 15 15 de l'ARNm de JAK2. Nous avons montré que l'inhibition de JAK2 diminuait fortement la capacité de clonage et la différenciation « spontanée » des progéniteurs de PV en l'absence d'Epo. Les progéniteurs érythroblastiques normaux transfectés avec le siRNA JAK2 ont un potentiel clonogénique diminué de 70% par rapport au siRNA contrôle ce qui confirme l'efficacité de la transfection avec le siRNA JAK2. Dans la PV, les effets 20 de l'inhibition de JAK2 dans les progéniteurs érythroblastiques ont été étudiés dans un modèle de culture sans Epo, permettant d'étudier les cellules du clone malin. Nous avons comparé le potentiel clonogénique, l'apoptose et la différenciation des progéniteurs érythroblastiques de PV après transfection par un siRNA JAK2 comparé à un siRNA contrôle. L'étude du potentiel clonogénique des progéniteurs de PV cultivés 25 sans Epo montre une très nette diminution du nombre de colonies après transfection du siRNA JAK2 par rapport au siRNA contrôle. L'étude en cytométrie de flux de l'apoptose de ces cellules montre une augmentation significative de l'apoptose dans les cellules transfectées par le siRNA JAK2 comparées au siRNA non relevant (70 versus 53%). L'étude des effets du siRNA JAK2 sur la différenciation (acquisition de la 30 Glycophorine A détectée en cytométrie de flux), ne montre qu'une légère différence entre les progéniteurs transfectés par le siRNA JAK2 versus le siRNA contrôle.

Les résultats des études cellulaires ont donc montré que JAK2 était nécessaire à la différenciation indépendante de l'Epo des progéniteurs érythroïdes de PV. Les premiers résultats des études biochimiques (immunoprécipitation) montrent une phosphorylation de JAK2 plus prolongée après déprivation en cytokines des progéniteurs érythroïdes de PV par rapport à des cellules normales.

1.2 Etude génomique de JAK2

La PCR sur les 23 exons a été mise au point sur un sujet normal à partir d'ADN génomique. Puis nous avons étudié 3 patients atteints de PV après avoir extrait l'ADN génomique de cellules érythroïdes obtenus *in vitro* après culture cellulaire.

Nous avons identifié une mutation ponctuelle située dans l'exon 12 de JAK2, présente chez 2 des 3 patients testés. Cette mutation touche la base n° 1849 de la séquence codante [numérotation débutant à l'ATG], GenBank NM_004972) transforme le codon 15 617 de la protéine JAK2 (V617F).

- Codon 617 normal : gtc code pour une Valine (V)
- Codon 617 muté : ttc code pour une Phénylalanine (F)

Nous avons vérifié grâce aux bases de données publiées sur Internet qu'il ne s'agissait pas d'un polymorphisme connu.

20 Nous avons ensuite élargi la cohorte. A ce jour, la mutation a été retrouvée chez 39 patients atteints de PV sur les 43 cas testés. Aucun témoin (15 cas testés) ou patient atteint de polyglobulie secondaire (18 cas testés) n'a été trouvé porteur de la mutation.

Résultats du séquençage chez les patients

25 • 39 mutés / 43 PV testés (90%)
• 2/3 hétérozygotes
• 13/39 « homozygotes » soit 30% des cas (même proportion que la perte d'hétérozygotie en 9p)

Contrôles

30 • 0 cas mutés sur 33 témoins testés

- Dont 15 sujets normaux
- Et 18 polyglobulies secondaires (pas de colonies spontanées)

La découverte de cette anomalie de JAK2 explique l'hypersensibilité à de nombreux facteurs de croissance impliquée dans la PV (Epo, TPO, IL-3, IL-6, GM-CSF, insuline). En effet, JAK2 est une protéine impliquée dans les voies de signalisation des récepteurs 5 de ces cytokines.

De plus, l'association de JAK2 avec R-Epo est singulière en cela que JAK2 est fixée à R-Epo de façon constitutive : l'association JAK2/R-Epo initiée dans l'appareil de Golgi, est nécessaire au processing de R-Epo à la membrane des érythroblastes. Une anomalie 10 de JAK2 à l'origine de modifications de l'association de JAK2 avec R-Epo pourrait donc expliquer la prédominance de l'hyperplasie médullaire sur la lignée érythroblastique, alors que cette protéine est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Par ailleurs, Moliterno et coll (Moliterno et al., 1998; Moliterno et Spivak, 1999) ont mis en évidence un défaut d'expression membranaire de mpl, lié à un défaut 15 de glycosylation. Il est possible que JAK2 soit, par analogie avec R-Epo, nécessaire au processing de c-mpl. L'anomalie de JAK2 pourrait alors expliquer le défaut d'expression membranaire de c-mpl, retrouvé dans la PV.

JAK2 se lie à R-Epo sur son domaine proximal au niveau d'un domaine très conservé, 20 la Box2. En l'absence de stimulation par l'Epo, JAK2 est constitutivement fixée à R-Epo, mais sous forme non phosphorylée donc non active. Après stimulation du récepteur par l'Epo, les deux molécules JAK2 se phosphorylent, puis phosphorylent R-Epo, ce qui permet le recrutement puis la phosphorylation d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal, comme les protéines STAT5, Grb2, PI3K. La protéine 25 JAK2 présente, comme toutes les JAKs, un domaine kinase fonctionnel (JH1), un domaine pseudo-kinase sans activité tyrosine kinase (JH2), et plusieurs domaines conservés (JH3-JH7), caractéristiques des membres de la famille des JAKs. Le domaine JH2 semble impliqué dans la régulation de l'activité tyrosine kinase de JAK2. D'après 30 les données disponibles de cartographie protéique de JAK2 (Lindauer, 2001), l'acide aminé 617 est situé dans ce domaine JH2, et d'après des études de modélisation, dans une région particulièrement importante pour la régulation de l'activité kinase.

Au delà de l'intérêt physiopathologique de cette découverte (compréhension des mécanismes d'indépendance aux cytokines, démembrément des différents SMP), la mise en évidence de la mutation chez un patient offre pour la première fois un test 5 permettant d'affirmer le diagnostic. Dans une démarche médicale diagnostique, la recherche de la mutation de JAK2 pourra se faire sur les polynucléaires sanguins, qui appartiennent au clone malin.

L'invention offre également la mise au point d'un traitement spécifique, de type inhibiteur de kinase spécifique de la protéine mutée, ou thérapie génique.

10

Exemple 2 : Détection du mutant JAK2 V617F pour le diagnostic de l'érythrocytose en première intention

15 **2.1 PATIENTS, MATERIAUX ET METHODES**

Comparaison du séquençage et de deux techniques de génotypage de SNP pour la détection de JAK2 V617F

Cellules du patient

20 On a analysé 119 échantillons à suspicion de MPD (c'est-à-dire d'érythrocytose, de thrombocytose, d'hyperleucocytose) : 58 échantillons sanguins ont été recueillis en perspective et 61 échantillons d'archive de moelle osseuse ont été analysés rétrospectivement.

25 On a isolé les granulocytes périphériques en utilisant une méthode de gradient de densité selon les instructions du fabricant (Eurobio, France). On a isolé les cellules mononucléaires de la moelle osseuse par l'utilisation d'une centrifugation au gradient de Ficoll. L'ADN génomique a été extrait avec des procédures standard. Pour établir la sensibilité des technologies LightCycler® et TaqMan®, l'ADN provenant d'un échantillon homozygote avec l'allèle de type sauvage résiduel minimal, a été dilué en 30 série dans de l'ADN normal.

Lignées cellulaires

On a utilisé des dilutions d'ADN en série (1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01) de la lignée cellulaire d'érythroleucémie humaine (HEL) mutée de façon homozygote (JAK2 V617F), dans de l'ADN de lignée cellulaire TF-1 (non mutée) en tant que contrôles positifs standard. Les lignées cellulaires ont poussé dans du milieu MEM-alpha (Invitrogen) enrichi avec du 5 sérum fœtal de veau.

Détection de la mutation par analyse de la courbe de fusion de LightCycler® avec des sondes d'hybridation FRET

On a conçu des amorces et des sondes pour amplifier et s'hybrider à la séquence cible 10 de l'exon 12 de JAK2. La position du site de mutation (1849G/T) était couverte par une sonde capteur donneuse marquée à la fluorescéine en 3' et la sonde d'ancrage accepteuse adjacente marquée avec du LightCycler® Red 640 (LCRed640) à son extrémité 5', et son extrémité 3' a été phosphorylée pour éviter l'extension. L'amplification et l'analyse de la courbe de fusion ont été mises en œuvre sur 15 l'instrument de LightCycler® (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le volume réactionnel final était de 20 µl en utilisant 10 ng d'ADN, 14 µl de mélange LightCycler FastStart DNA Master, 3 mM de MgCl₂, 0,2 µM d'amorces, 0,075 µM de chaque sonde. En bref, les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 10 minutes et une amplification par PCR de 45 cycles (10 secondes à 95°C, 10 secondes à 53°C, 15 secondes à 72°C) a été suivie par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 20 secondes, deux étapes d'hybridation à 63°C et 45°C pendant 30 secondes chacune et une courbe de fusion se situant dans le domaine compris entre 45 et 70°C (0,1°C/sec). L'analyse sur le programme LightCycler® a été réalisée par le tracé de la courbe de la dérivée de la fluorescence par rapport à la température [2(dF12/F11)/dT] versus T]. Les 25 pics mutés et WT ont été respectivement observés à 57 et 63°C.

Détection de la mutation par amplification spécifique d'un allèle par TaqMan®

Deux amorces ont été conçues pour amplifier un produit de 92 pb englobant le SNP à la 30 position 1849. Deux sondes MGB fluorogéniques ont été conçues avec différents colorants fluorescents, un ciblé vers l'allèle WT et un ciblé vers celui muté. On a réalisé le génotypage dans des plaques à 96 puits, en utilisant la méthode basée sur la TaqMan® PCR. Le volume réactionnel final était de 12,5 µl en utilisant 10 ng d'ADN

génomique, 6,25 µl de TaqMan® Universal Master Mix et 0,31 µl de 40X Assays-on-Demand SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems). La plaque a été chauffée à 95°C pendant 10 minutes, suivi par 40 cycles de dénaturation à 92°C pendant 15 secondes et un appariement/extension à 60°C pendant 1 minute. Le thermocyclage a été 5 réalisé sur le 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). L'analyse a été effectuée avec le programme SDS version 1.3. Le génotypage de la discrimination allélique en point final a été réalisé par inspection visuelle d'une courbe de la fluorescence (Rn) provenant de la sonde WT contre la Rn de la JAK2 mutée générée à partir de la lecture de la fluorescence post-PCR.

10

Patients avec une érythrocytose et collecte d'échantillons

Nous avons évalué 88 patients avec des taux d'hématocrites supérieurs à 51%, au moment du diagnostic, avant un quelconque traitement, et étudié la présence des critères WHO et PVSG. La valeur de 51% a été retenue pour l'extrême supérieure du domaine 15 normal pour le taux de l'hématocrite (Pearson TC et al., A Polycythemia Vera Updated : Diagnosis, Pathobiology, and Treatment. Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.) 2000 : 51 à 68). Les cellules de la moelle osseuse ont été recueillies pour des dosages clonogéniques et les cellules excédentaires ont été recueillies pour l'extraction 20 d'ADN. On a mesuré l'érythropoïétine sérique (Epo) dans différents laboratoires, et elle est par conséquent, rapportée comme étant basse quand elle est en dessous de la valeur inférieure du domaine normal de chaque laboratoire, normale ou élevée. Les 25 granulocytes périphériques provenant des mêmes patients ont été purifiés comme décrit précédemment, les échantillons sanguins de chaque temps étaient disponibles. Les échantillons de moelle osseuse et de sang ont été recueillis après qu'on ait obtenu un consentement éclairé.

Dosages des EEC

Les dosages *in vitro* du caractère répondeur érythroïde à l'Epo ont tous été réalisés dans le même laboratoire (Hôtel Dieu, Paris) avec une technique de culture de plasma-caillot, 30 comme décrit précédemment (Casadevall N, Dupuy E, Molho-Sabatier P, Tobelem G, Varet B, Mayeux P. Autoantibodies against erythropoietin in a patient with pure red-cell aplasia. N. Engl. J. Med. 1996 ; 334 : 630 à 633).

Analyse statistique

La corrélation des marqueurs a été réalisée en utilisant le coefficient de rangs Spearman (R).

5 2.2 RESULTATS**Faisabilité et sensibilité des techniques de génotypage basées sur la PCR pour la détection de la mutation JAK2 V617F**

Pour évaluer l'efficacité du séquençage, des technologies LightCycler® et Taqman® pour détecter la mutation JAK2 V617F, nous avons cherché sa présence dans 119 échantillons provenant de patients avec une suspicion de MPD, en utilisant les 3 techniques en parallèle. La mutation JAK2 V617F a été efficacement détectée dans 83/119 échantillons, et 35 échantillons ne présentaient la mutation par aucune des 3 techniques. Dans un échantillon seulement, le séquençage a échoué à détecter la mutation révélée par les deux technologies LightCycler® et Taqman®, suggérant ainsi que ces dernières puissent être plus sensibles.

Pour évaluer la sensibilité de la technique, nous avons utilisé deux méthodes différentes : nous avons testé des dilutions en série de l'ADN de la lignée cellulaire HEL mutée de façon homozygote dans l'ADN de la lignée cellulaire TF-1 non mutée, et des dilutions en série de l'ADN génomique provenant d'un patient homozygote pour la mutation JAK2 V617F dans de l'ADN normal. Le séquençage a échoué à détecter l'allèle muté sous 5% d'ADN de lignée cellulaire HEL dilué dans de l'ADN de lignée cellulaire TF-1, et sous 10% de l'ADN du patient muté de façon homozygote dilué dans de l'ADN normal. La sensibilité des techniques LightCycler® et Taqman® était équivalente, légèrement supérieure au séquençage, atteignant 0,5 à 1% de l'ADN de la lignée cellulaire HEL dilué dans de l'ADN de la lignée cellulaire TF-1 (figure 6), et 2 à 4% de l'ADN d'un patient muté de façon homozygote dilué dans de l'ADN normal.

Caractéristiques des patients avec une érythrocytose au moment du diagnostic

Les caractéristiques principales de 88 patients avec des taux d'hématocrites supérieurs à 30 51%, au moment du diagnostic, sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des patients

	Critère WHO		Critère PVSG		Critères WHO et PVSG	
	PV n = 61	Erythrocytose idiopathique n = 11	PV n = 45	Erythrocytose idiopathique n = 21	Erythrocytose secondaire n = 5	Ht>50%, mais pas d'AE n = 3
Rapport des sexes (mâle/femelle)	38/23	11/0	28/17	18/3	4/1	3/0
Age moyen (domaine)	61 (23 à 92)	57 (24 à 81)	58 (23 à 92)	60 (53 à 81)	65 (55 à 77)	48,6
Ht moyens (%) +/- σ	59 +/- 4,6	54,6 +/- 1,44	59,2 +/- 4,5	57,8 +/- 4,2	55,8 +/- 3,1	53,3 +/- 0,8
Hb moyenne (g/dL) +/- σ	19,2 +/- 1,39	18,3 +/- 0,34	19,3 +/- 1,41	19 +/- 1,0	18,9 +/- 0,8	18,6 +/- 0,5
WBC moyens ($\times 10^3$) +/- σ	12,2 +/- 4,4	7,0 +/- 2,5	13,5 +/- 4,9	8,2 +/- 2,5	8,8 +/- 1,9	6,6 +/- 0,4
Compte des plaquettes moyen ($\times 10^3$) +/- σ	463 +/- 148	212 +/- 38	503 +/- 149	245 +/- 60,4	212 +/- 29	175 +/- 19
Splénomégalie	16/55	0/11	14/39	0/21	0/5	0/3
Présence d'EEC	59/60	1/11	43/44	11/21	0/5	0/3
Niveau d'Epo bas	39/47	2/8	27/33	10/17	0/3	1/1
Niveau d'Epo normal	8/47	6/8	6/33	7/17	3/3	0/1
Anomalies cytogénétiques	7/32	0/3	6/23	0/7	nd	0/1
JAK2 V617F positive	57/61	0/11	43/45	8/21	0/5	0/3

5

88 patients avec des taux d'hématocrites supérieurs à 51% ont été diagnostiqués selon les critères PVSG et WHO, en quatre groupes : maladie de Vasquez (PV), érythrocytose idiopathique, érythrocytose secondaire et « pas d'érythrocytose absolue » (pas d'AE) quand la mesure de la masse des globules rouges n'avait pas augmenté. 8 patients ne pouvaient avoir aucun diagnostic défini, puisque quelques données cliniques n'étaient

pas disponibles. Ht : hématocrites ; Hb : hémoglobine ; WBC : globules blancs sanguins ; EEC : colonies érythroïdes endogènes ; Epo : érythropoïétine ; σ : écart type. Les patients pouvaient être séparés en 4 groupes principaux, respectivement selon les critères WHO (Pierre R. et al., éditeurs. World Health Organization Classification of 5 Tumours ; Pathology and Genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon : IARC Press ; 2001 : 32 à 34) et PVSG (Pearson TC, Messiney M. The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. Leuk Lymphoma 1996 : 22 Suppl 1 : 87 à 93) : 61 à 45 patients avec le diagnostic de PV, 5 avec une érythrocytose secondaire, 11 à 21 avec une érythrocytose idiopathique et 3 sans érythrocytose absolue (masse des 10 globules rouges normale). Les données cliniques étaient incomplètes pour 7 patients, expliquant pourquoi le diagnostic de PV ne pouvait pas être affirmé soit avec les critères WHO soit avec ceux PVSG. En raison des différences entre les critères A1 des deux classifications, 6 patients qui n'avaient aucune mesure de masse de globules rouges, pouvaient être classés dans la classification WHO et pas dans celle PVSG. Un patient 15 avait à la fois une hypoxie et une formation d'EEC, rendant par conséquent le diagnostic difficile. Une analyse cytogénétique a été réalisée chez 35 patients ; parmi 32 patients PV (selon le critère WHO), 7 avaient des anomalies cytogénétiques : 5 avec une trisomie 9, 1 avec 7q- et 1 avec du matériel supplémentaire sur le chromosome 18.

20 **La présence de JAK2 V617F correspond aux critères PVSG et WHO de PV**
JAK2 V617F était présente dans 43/45 (96%) patients diagnostiqués en tant que PV selon les critères PVSG et dans 57/61 (93%) patients diagnostiqués avec les critères WHO (tableau 1). Néanmoins, 8/29 patients classés en tant que non PV selon la classification PVSG présentaient la mutation, alors qu'aucun des 19 patients non PV du 25 WHO ; ces 8 patients étaient considérés IE avec les critères PVSG et PV avec ceux WHO. Aucun des patients diagnostiqués SE ni celui avec une masse de globules rouges normale (« pas d'AE ») n'avaient la mutation. La présence ou l'absence de JAK2 V617F correspond ainsi au diagnostic positif de PV dans 76/80 patients (95%, R = 0,879, p<0,0001) si on utilise les critères WHO et dans 64/74 patients (86,5%, R = 0,717, p<0,0001) avec les critères PVSG. En outre, puisqu'aucun des patients 30 diagnostiqués en tant que non PV avec les critères WHO n'avait la mutation, la

détection de JAK2 V617F a une valeur prédictive de 100% dans le contexte de l'érythrocytose absolue.

Quelques auteurs (Mossuz P. et al., Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica* 2004 ; 89 : 1194 à 1198) 5 considèrent la mesure du niveau d'Epo sérique comme un test de diagnostic en première intention pour les patients avec une érythrocytose absolue, avec une spécificité de 97% et une valeur prédictive de 97,8% pour le diagnostic de PV, si le niveau d'Epo est en dessous de la valeur inférieure du domaine normal. Dans notre étude, la corrélation entre le niveau d'Epo et le diagnostic de PV selon les critères WHO et PVSG a été 10 observée respectivement dans 50/61 (82%, R = 0,488, p = 0,0002) et 39/56 (70%, R = 0,358, p = 0,0067) patients. Nous avons ensuite comparé le niveau d'Epo sérique en présence ou en l'absence de V617F JAK2 et on a trouvé que 52/68 patients (76%, R = 0,416, p = 0,0004) avaient une corrélation adéquate.

La présence de la mutation JAK2 V617F correspond à la capacité de former des EEC. 15 Trois équipes différentes ont montré que des lignées cellulaires dépendantes de l'Epo transfectées avec JAK2 V617F étaient indépendantes ainsi qu'hypersensibles à l'Epo pour leur croissance, mimant ainsi l'indépendance et l'hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes décrits dans la PV. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que les patients portant JAK2 V617F présentaient aussi une formation d'EEC. Parmi les 20 patients avec une érythrocytose qui n'avaient aucune formation d'EEC, un présentait la mutation, soulevant la question de la valeur prédictive positive de la détection de JAK2 V617F ; cependant, même si ce patient ne présentait aucune EEC, il remplissait de nombreux critères WHO et PVSG positifs, lui permettant d'être classé comme PV dans les deux classifications. Ce patient devrait par conséquent être considéré comme un 25 « faux négatif aux EEC » plutôt que comme un « faux positif pour JAK2 ». Parmi les 67 patients qui avaient des EEC, 62 portaient la mutation JAK2 V617F, 5 patients n'étant pas mutés en utilisant des techniques sensibles pour la détection. Parmi ces 5 patients, 4/5 et 2/5 pouvaient être classés dans le groupe PV, respectivement selon les critères WHO et PVSG. Au total, les 87 patients analysés, la présence ou l'absence de la 30 mutation JAK2 V617F correspondaient à la capacité ou à l'incapacité de former des EEC dans 81/87 patients (93,1%, R = 0,824, p<0,0001).

La présence de la mutation JAK2 V617F dans les cellules mononucléaires de la moelle osseuse (BMMC) correspond à sa présence dans les granulocytes périphériques.

Pour étudier si l'utilisation des granulocytes du sang périphérique pour détecter la mutation JAK2 V617F au moment du diagnostic pourrait éviter la réalisation du dosage

5 sur les cellules de moelle osseuse, nous avons comparé les résultats obtenus par l'une ou l'autre des méthodes de séquençage, de LightCycler® et de TaqMan® chez 50 patients (incluant 35 PV, 8 SE et 8 autres suspicions de MPD) dont à la fois des échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique étaient disponibles au moment du diagnostic.

Dans tous les cas (34 mutés, 16 non mutés), la mutation a été détectée de façon

10 identique.

III- Conclusion

Nous proposons ainsi une nouvelle fiche de diagnostic de PV où la détection de JAK2 V617F dans les granulocytes avec des techniques sensibles est la première étape dans le diagnostic d'une érythrocytose, sauf dans le cas d'une érythrocytose secondaire évidente (figure 7). Cette attitude a plusieurs avantages : elle évite la réalisation d'une mesure de la masse des globules rouges isotopiques, qui n'est pas toujours disponible et dont le résultat est quelquefois sujet à controverse. Elle peut aussi éviter un aspirat de

15 moelle osseuse et la réalisation des dosages d'EEC qui prennent du temps et ne sont pas bien standardisés. Elle diminue drastiquement le coût du diagnostic positif de PV, puisque seuls les patients avec des taux d'hématocrites supérieurs à 51% et négatives pour JAK2 V617F devraient avoir toutes les investigations qui sont réellement effectuées pour caractériser une érythrocytose. Même si la détection seule de JAK2

20 V617F dans le contexte de l'érythrocytose soutiendra le diagnostic de PV, la réalisation d'une biopsie de moelle osseuse peut encore être utile, puisqu'elle peut montrer des signes de myélofibrose ou la présence de cellules blastiques, affirmant par conséquent la transformation leucémique de la PV. Néanmoins, il nous semble qu'une biopsie de

25 moelle osseuse devrait être réalisée dans le contexte d'une étude éventuelle, avec une analyse cytogénétique.

On a aussi détecté JAK2 V617F dans 30% des ET, 50% des IMF et quelques MPD rares non caractérisées, définissant par conséquent un nouveau groupe de MPD avec

différentes présentations cliniques. Les raisons de ces différences sont encore inconnues et il est encore trop tôt pour regrouper ces maladies en une unique entité myéloproliférative avec une cause physiopathologique commune et différents phénotypes. Des études éventuelles cliniques précises caractériseraient plus précisément 5 les signes communs entre PV, ET, IMF et d'autres MPD rares qui portent JAK2 V617F, spécialement en terme d'érythrocytose absolue, de niveau d'Epo, de myélofibrose et des anomalies cytogénétiques. On envisage ainsi d'utiliser la détection de JAK2 V617F en tant qu'outil initial dans le diagnostic de l'hyperleucocytose chronique, la thrombocytose et l'érythrocytose. La présence de JAK2 V617F ne permettra pas 10 seulement une nouvelle définition d'un groupe de MPD, mais elle sera aussi certainement la base pour le développement de thérapies ciblées spécifiques.

Exemple 3 : Les siRNA spécifiques de la mutation V617F JAK2 inhibent V617F JAK2 mais pas JAK2 WT.

15

Les siRNA 1, 3 et 4 correspondants aux SEQ ID No 25 à 27 inhibent la protéine mutée V617F JAK2 exprimée par la lignée HEL sans inhiber la protéine sauvage JAK2 exprimée par la lignée K562. Les résultats sont reportés aux figures 8, 9 et 10.

20

25

30

REFERENCES

- Andersson, P., LeBlanc, K., Eriksson, B. A., and Samuelsson, J. (1997). No evidence for an altered mRNA expression or protein level of haematopoietic cell phosphatase in CD34+ bone marrow progenitor cells or mature peripheral blood cells in polycythaemia vera. *Eur J Haematol* 59, 310-7.

5 - Asimakopoulos, F. A., Hinshelwood, S., Gilbert, J. G., Delibrias, C. C., Gottgens, B., Fearon, D. T., and Green, A. R. (1997). The gene encoding hematopoietic cell phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythaemia vera. *Oncogene* 14, 1215-22.

10 - Casadevall, N., Vainchenker, W., Lacombe, C., Vinci, J., Chapman, J., Breton-Gorius, J., and Varet, B. (1982). Erythroid progenitors in Polycythaemia Vera. demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum-free cultures. *Blood* 59, 447-451.

15 - Hess, G., Rose, P., Gamm, H., Papadileris, S., Huber, C., and Seliger, B. (1994). Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 88, 794-802.

- Kralovics, R., Guan, Y., and Prchal, J. T. (2002). Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythaemia vera. *Exp Hematol* 30, 229-36.

20 - Le Couedic, J. P., Mitjavila, M. T., Villeval, J. L., Feger, F., Gobert, S., Mayeux, P., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (1996). Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 87, 1502-11.

25 - Lindauer, K., Loerting, T., Liedl, K. R., and Kroemer, R. T. (2001). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 14, 27-37.

- Means, R. T., Krantz, S. B., Sawyer, S., and Gilbert, H. (1989). Erythropoietin receptors in polycythaemia vera. *J Clin Invest* 84, 1340.

30

- Moliterno, A. R., Hankins, W. D., and Spivak, J. L. (1998). Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 338, 572-580.
- Moliterno, A. R., and Spivak, J. L. (1999). Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 94, 2555-61.
- 5 - Pahl, H. L. (2000). Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 267, 3395-401.
- Pearson (2001). Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Semin Hematol.* 38, 21-4.
- 10 - Roder S, S. C., Meinhardt G, Pahl HL. (2001). STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol* 29, 694-702.
- Silva, M., Richard, C., Benito, A., Sanz, C., Olalla, I., and Fernandez-Luna, J. L. (1998). Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 338, 564-71.
- 15 - Temerinac, S., Klippe, S., Strunck, E., Roder, S., Lubbert, M., Lange, W., Azemar, M., Meinhardt, G., Schaefer, H. E., and Pahl, H. L. (2000). Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 95, 2569-76.
- Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., Lécluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independant differentiation of erythroid progenitors in Polycythemia Vera. *Experimental Hematology* 32, 179-187.
- 20

REVENDICATIONS

- 5 1. Protéine isolée JAK2 (Janus kinase 2), caractérisée en ce qu'elle comprend une mutation sur l'acide aminé 617, plus particulièrement la mutation V617F, ci-après dénommée « variant JAK2 V617F », dont la séquence est présentée à la SEQ ID No 1, ou une séquence similaire chez d'autres mammifères.
- 10 2. Séquence nucléotidique codant pour le variant JAK2 V617F selon la revendication 1, notamment la séquence SEQ ID No 2 possédant la mutation t/g en position 1849 à partir de l'ATG marquant le début de la transcription.
- 15 3. Vecteur de clonage et/ou d'expression viral, plasmidique ou sous forme d'ADN nu caractérisé en ce qu'il comprend la séquence selon la revendication 2 sous le contrôle d'un promoteur efficace dans les cellules de mammifères.
- 20 4. Cellule de mammifère exprimant le variant JAK2 V617F recombinant selon la revendication 1.
5. Animal transgénique non humain exprimant JAK2 V617F recombinant selon la revendication 1.
- 25 6. Animal transgénique non humain selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souris ou d'un rat ayant intégré dans son génome au moins la séquence codante pour JAK2 V617F par recombinaison homologue ou recombinaison dirigée.
- 30 7. Animal transgénique non humain selon la revendication 5 ou 6 caractérisé en ce qu'il est homozygote JAK2 V617F / JAK2 V617F ou hétérozygote JAK2 V617F / JAK2, lesdits animaux reproduisant la polyglobulie de Vaquez et/ou des syndromes myéloprolifératifs induits par JAK2 V617F.

8. Sondes ou amorces comprenant de 10 à 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID No 3 ou 4 et comprenant le nucléotide muté t¹⁸⁴⁹.
9. Sondes ou amorces selon la revendication 8 sélectionnées parmi les séquences SEQ ID No 5 à 11 et 15 à 28.
10. Méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour déterminer la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans un échantillon d'un patient atteint de PV ou susceptible de développer une PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif, notamment de l'éthrocytose, les hyperleucocytoses, des thrombocytoses et myélofibroses, comprenant :
 - a) l'obtention d'un échantillon d'acide nucléique du patient,
 - b) la détection de la présence ou de l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans ledit échantillon d'acide nucléique, caractérisée en ce que la présence du variant G1849T est une indication de PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.
11. Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'hybridation avec au moins une sonde selon l'une des revendications 8 à 9.
12. Méthode selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'amplification par réaction PCR avec au moins une paire d'amorces selon l'une des revendications 8 à 9.
13. Méthode selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle est effectuée sur les ARNm d'un individu et comprenant une réaction RT-PCR.
14. Méthode selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'amplification au moyen desdites amorces, suivie par une étape d'hybridation avec au moins une sonde, de préférence deux sondes qui s'hybrident en condition de forte stringence aux séquences correspondant à la région de la mutation G1849T et la détection du signal produit par les marqueurs desdites sondes, les sondes et amorces étant définies à la revendication 8 ou 9.

15. Méthode selon la revendication 10 comprenant la détection de la présence ou de l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans ledit échantillon d'acide nucléique au moyen d'un ou plusieurs SNP (Single nucleotide polymorphism) spécifique de la 5 mutation G1849T du gène JAK2, notamment les SEQ ID No 17 et 18, 23 et 24 ou encore 27 et 28.
16. Méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon d'un patient atteint ou susceptible de développer la PV ou 10 tout autre syndrome myéloprolifératif comprenant :
 - a) l'obtention d'un échantillon du patient,
 - b) la détection de la présence ou de l'absence du variant JAK2 V617F, caractérisée en ce que la présence dudit variant est une indication de la PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.
- 15 17. Méthode selon la revendication 16 comprenant la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps spécifique du variant V617F de la protéine JAK2, de préférence un anticorps capable de faire la distinction entre le variant V617F et la protéine JAK2 non mutée.
- 20 18. Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que les anticorps sont des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, simple chaîne ou double chaîne, des anticorps chimériques, humanisés ou des fragments de liaison à l'antigène F(ab')2 et F(v).
- 25 19. Méthode selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un test ELISA.
20. Méthode selon l'une des revendications 10 à 19 caractérisé en ce qu'elle est pratiquée pour la sous-population de patients présentant un taux d'hématocrites supérieur à 51%.

21. Méthode selon l'une des revendications 10 à 19 caractérisé en ce qu'elle est pratiquée pour la sous-population de patients présentant un taux de plaquettes supérieur à 450 000.

5 22. Anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le variant JAK2 V617F.

23. Hybridome produisant un anticorps selon la revendication 22.

24. Kit pour détecter le variant JAK2 V617F dans une tumeur comprenant une ou 10 plusieurs amorces ou sondes telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

25. Kit pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout 15 autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F, notamment de l'éthrocytose, les hyperleucocytoses, des thrombocytoses et myélofibroses, comprenant une ou plusieurs sondes ou amorces telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

20 26. Kit selon la revendication 24 ou 25 comprenant en outre au moins un élément choisi parmi une polymérase thermorésistante pour l'amplification PCR, une ou plusieurs solutions pour l'amplification et/ou l'étape d'hybridation, ainsi que tout réactif permettant la détection du marqueur.

25 27. Kit pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F comprenant un anticorps selon la revendication 22.

30 28. siRNA capable de diminuer de plus de 50% ou encore de plus de 95% l'expression du variant JAK2 V617F selon la revendication 1.

29. siRNA selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il possède de 19 à 25 nucléotides, de préférence 19 nucléotides de long, la séquence d'un premier brin étant identique et la séquence d'un deuxième brin étant complémentaire à la séquence SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou encore la séquence SEQ ID No 11 comprenant le nucléotide 5 muté t¹⁸⁴⁹.

30. siRNA selon la revendication 28 ou 29, caractérisé en ce qu'il induit une diminution supérieure à 80% ou 95% de l'expression de JAK2 V617F et qu'il n'induit qu'une diminution inférieure à 25% ou 5% de l'expression de JAK2 sauvage.

10

31. siRNA selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué de:

- UGGAGUAUGUUUCUGUGGA (SEQ ID No 29)
- GGAGUAUGUUUCUGUGGAG (SEQ ID No 30)
- 15 - GAGUAUGUUUCUGUGGAGA (SEQ ID No 31)

32. Procédé permettant de déterminer l'inhibition spécifique de JAK2 V617F par un ou plusieurs composés comprenant les étapes consistant à :
a) mettre en contact un ou plusieurs composés avec la protéine JAK2 V617F selon la 20 revendication 1, une fraction membranaire comprenant JAK2 V617F, ou encore une cellule exprimant JAK2 V617F selon la revendication 4 dans des conditions appropriées pour une fixation et/ou de l'inhibition et,
b) une détection de la fixation spécifique et/ou de l'inhibition de JAK2 V617F.

25 33. Procédé de criblage comprenant une succession de tests selon la revendication 32 de plusieurs molécules et une étape de sélection des molécules présentant une IC50 pour JAK2 V617F inférieure à 1 µM, de préférence 100 nM.

34. Procédé selon la revendication 33 comprenant en outre une sélection négative des 30 molécules qui possèdent une IC50 pour JAK2 inférieure à 5 µM ou 1 µM.

35. Procédé de criblage *in vitro* selon l'une des revendications 32 à 34 dans lequel on détermine par immunoprécipitation l'inhibition de la phosphorylation de JAK2 V617F.

36. Procédé de criblage *in vivo* selon l'une des revendications 32 à 35 sur des cellules 5 primaires progénitrices CD34+ JAK2 V617F qui sont capables de se différencier sans érythropoïétine (Epo) ou sur des lignées cellulaires devenues facteur indépendantes par introduction du variant JAK2 V617F.

37. Procédé de criblage *in vivo* selon l'une des revendications 32 à 36 au moyen d'une 10 cellule selon la revendication 4.

38. Procédé pour l'identification de candidats médicaments comprenant les étapes consistant à :

- a) administrer des composés à un animal transgénique non humain exprimant JAK2 15 V617F tel que défini à l'une des revendications 5 à 7, ledit animal reproduisant la polyglobulie de Vaquez et/ou étant atteint d'un syndrome myéloprolifératif associé à la présence de JAK2 V617F,
- b) déterminer l'effet du composé et sélectionner les candidats médicaments pour 20 lesquels on observe une diminution ou un blocage de la prolifération et de la différenciation spontanées des érythroblastes de polyglobulie de Vaquez ou une diminution de la prolifération cellulaire associé à la présence de JAK2 V617F.

39. Utilisation des SiRNA selon l'une des revendications 28 à 31 pour la fabrication d'un médicament.

25 40. Utilisation selon la revendication 39 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des hémopathies malignes, en particulier les syndromes myéloprolifératifs comprenant la Polyglobulie de Vaquez, la thrombocythémie essentielle, la splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive.

30 41. Utilisation selon la revendication 39 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des syndromes myéloprolifératifs associées à la mutation JAK2 V617F, et

des autres hémopathies malignes et des tumeurs solides tels que des carcinomes, des mélanomes et des neuroblastomes, qui expriment JAK2 V617F.

42. Composition comprenant un siRNA selon l'une des revendications 28 à 31 et un
5 véhicule pharmaceutiquement acceptable.

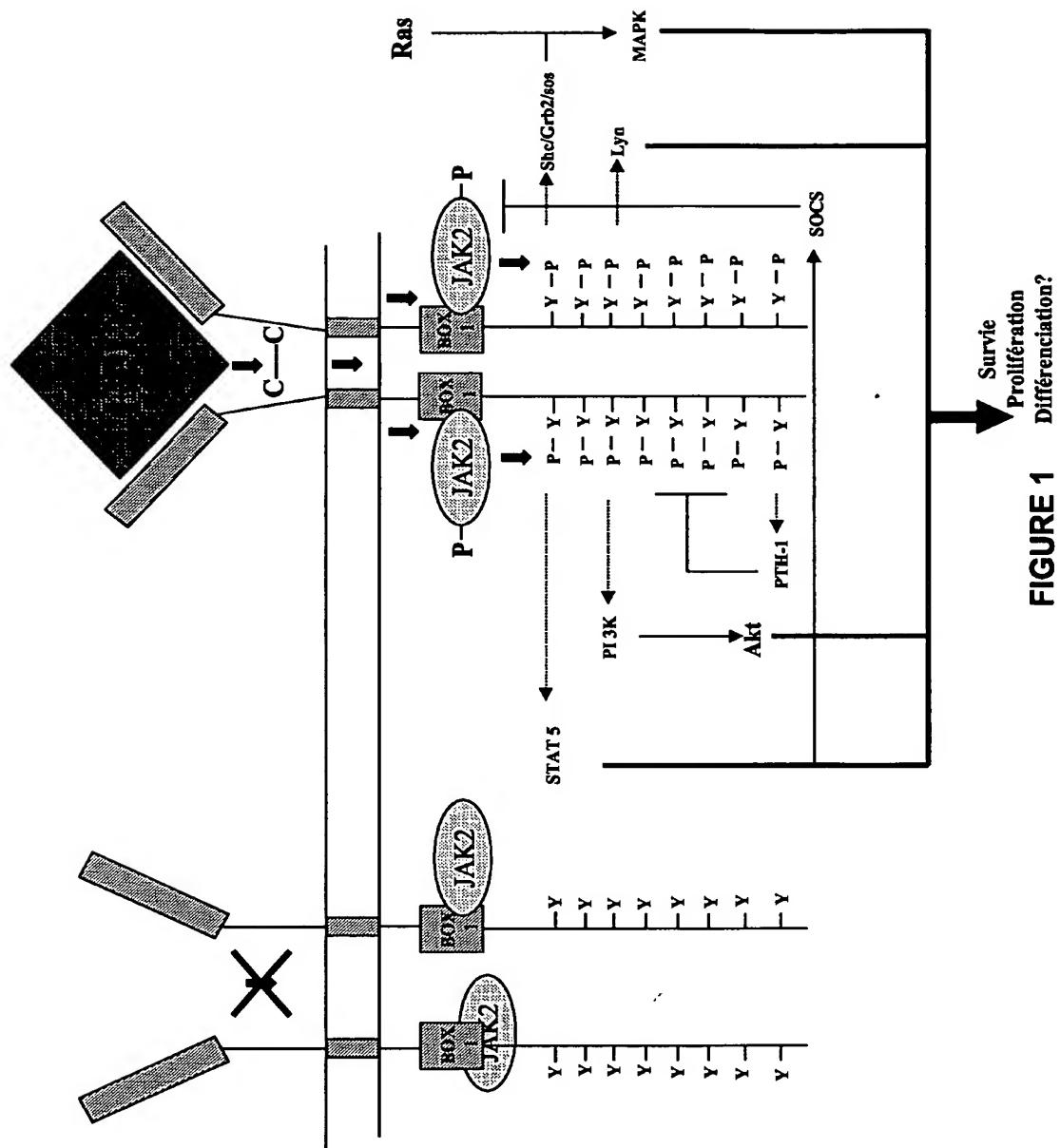


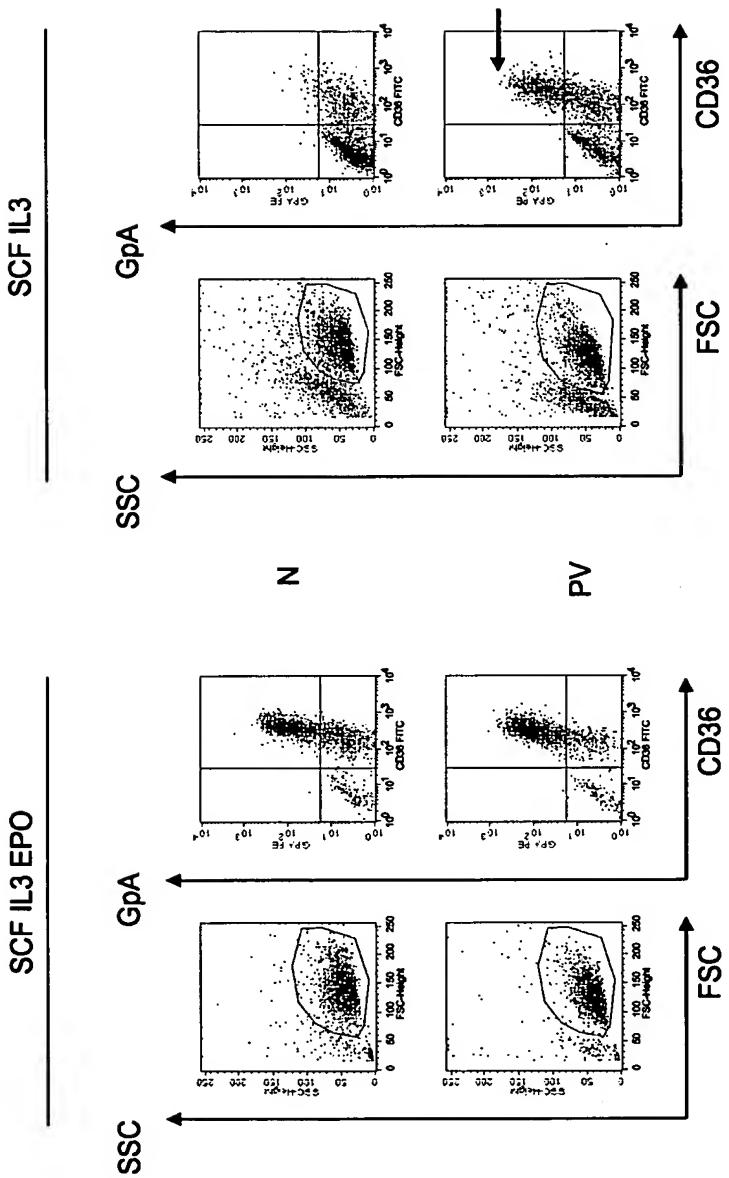
FIGURE 1

BEST AVAILABLE COPY

2 / 11

FIGURE 2A

FIGURE 2B



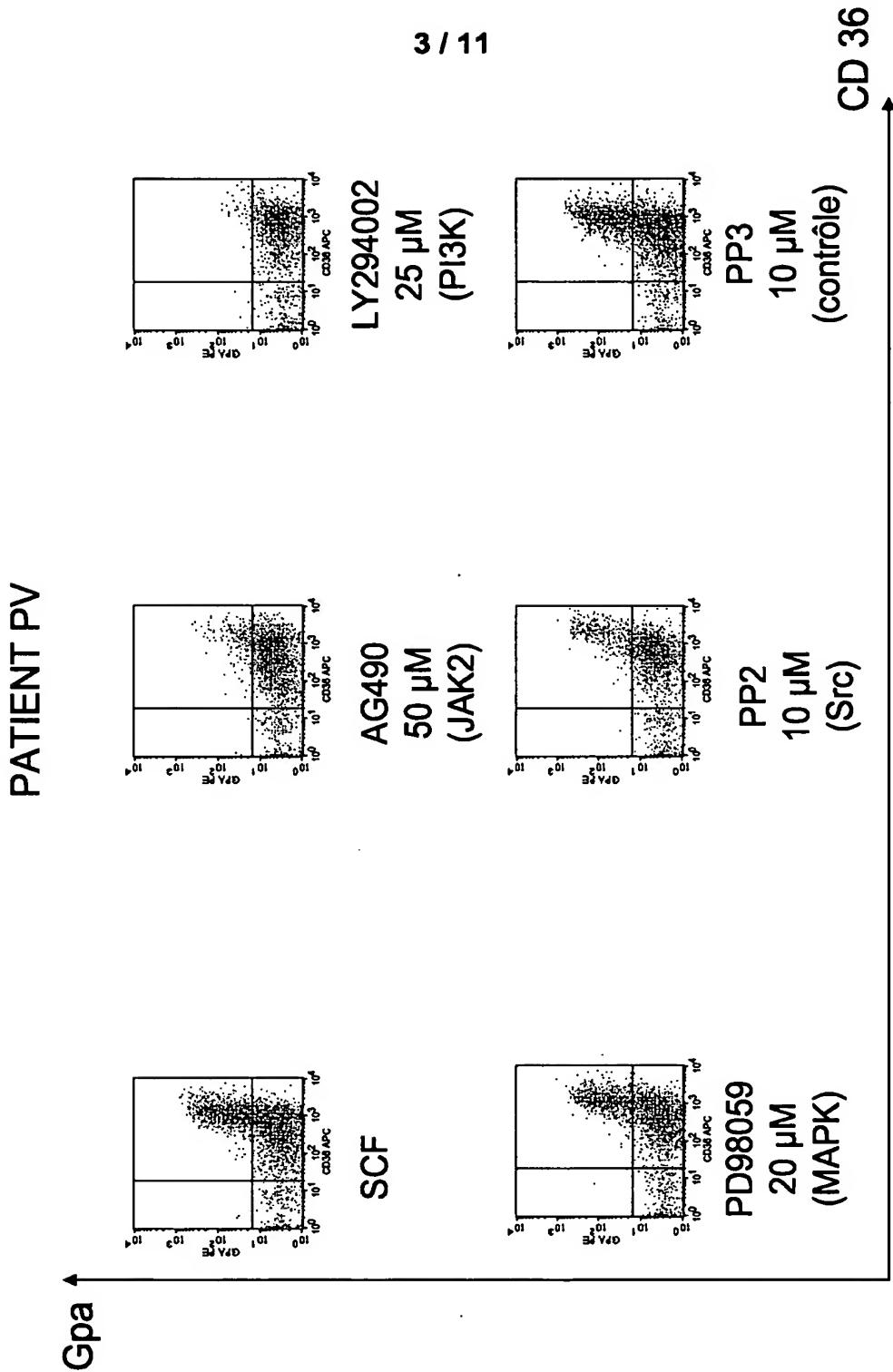


FIGURE 3

4 / 11

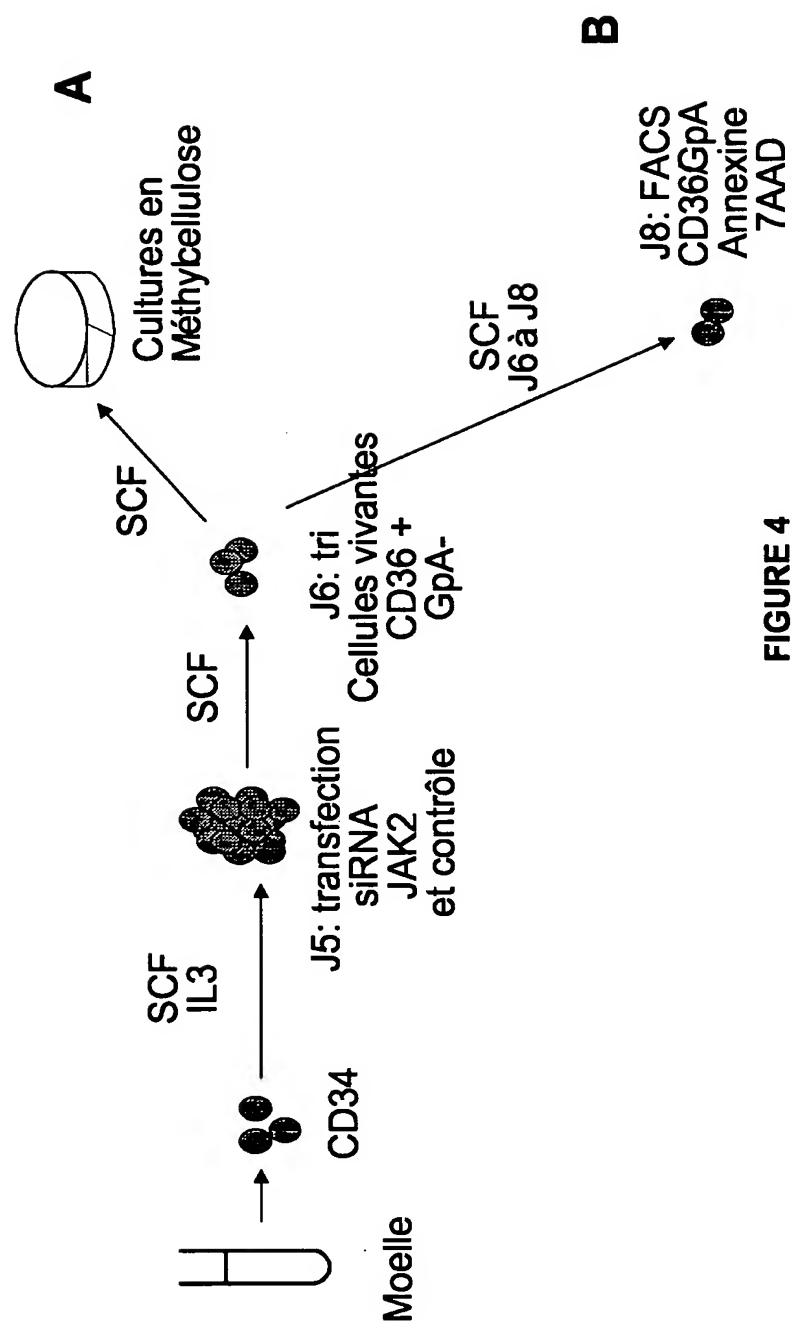


FIGURE 4

5 / 11

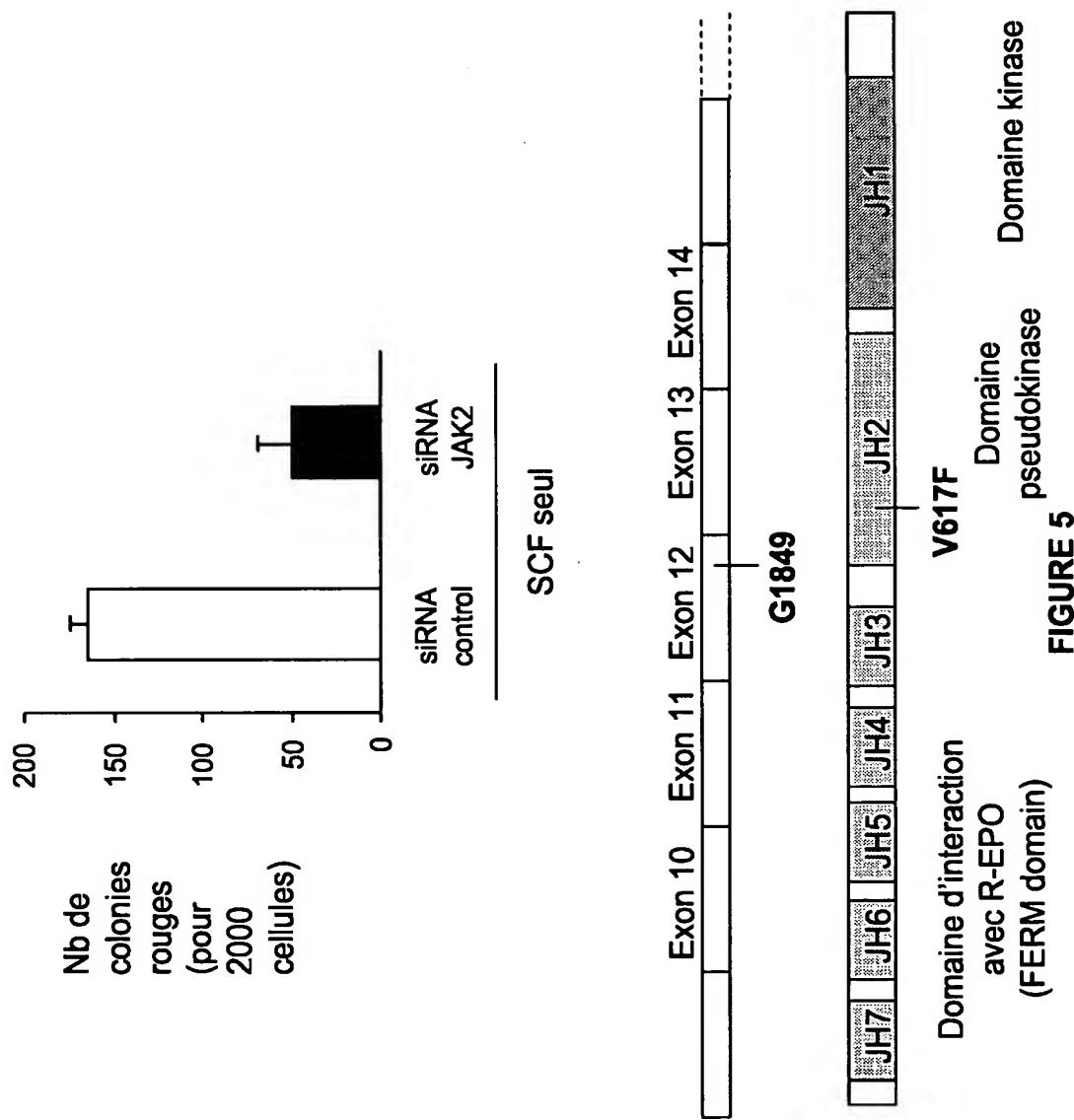


FIGURE 5

6 / 11

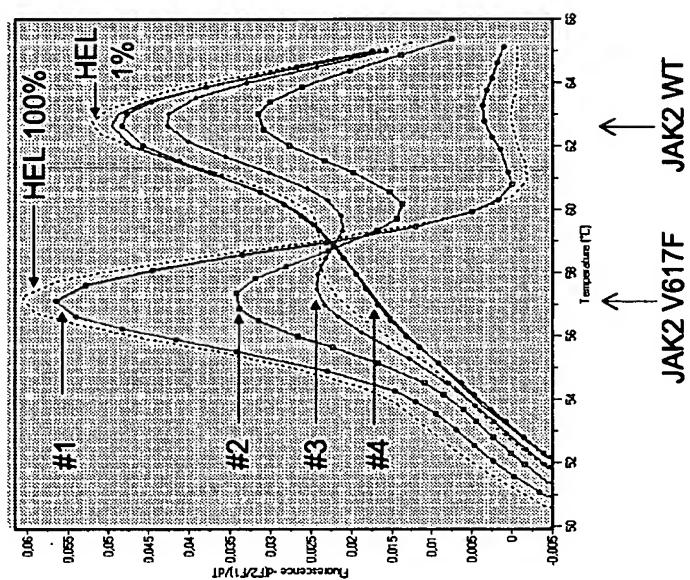


FIGURE 6B

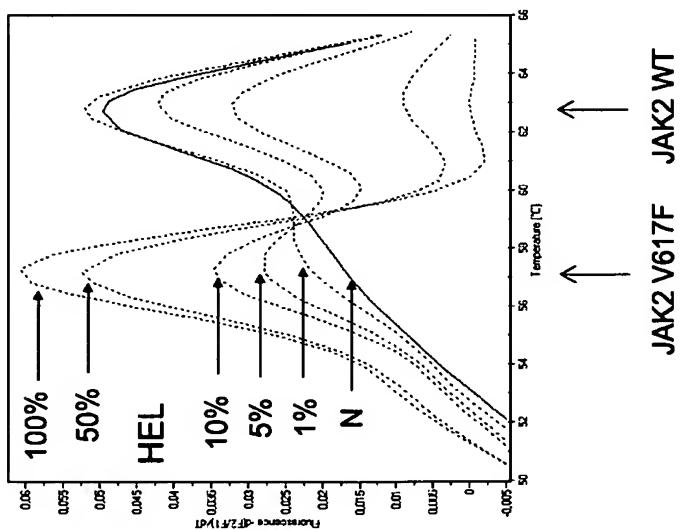
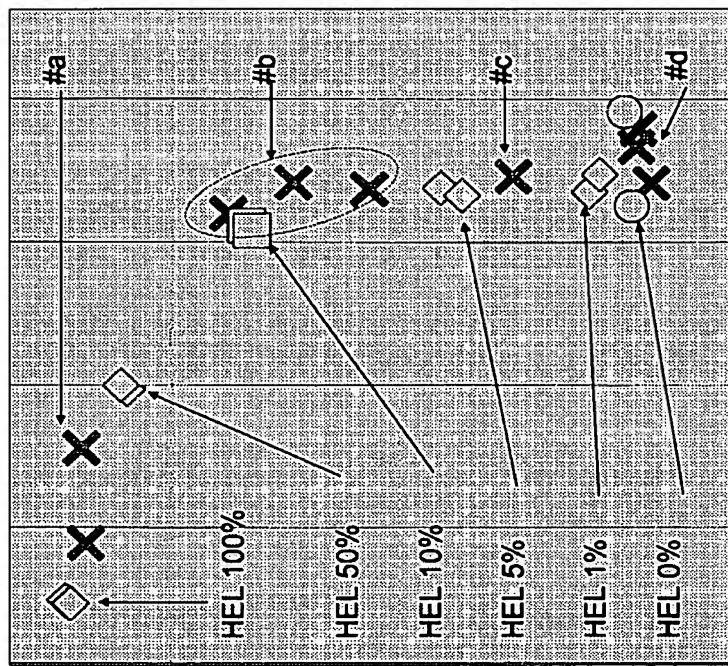


FIGURE 6A

7 / 11



JAK2 WT

FIGURE 6C

JAK2 V617F

8 / 11

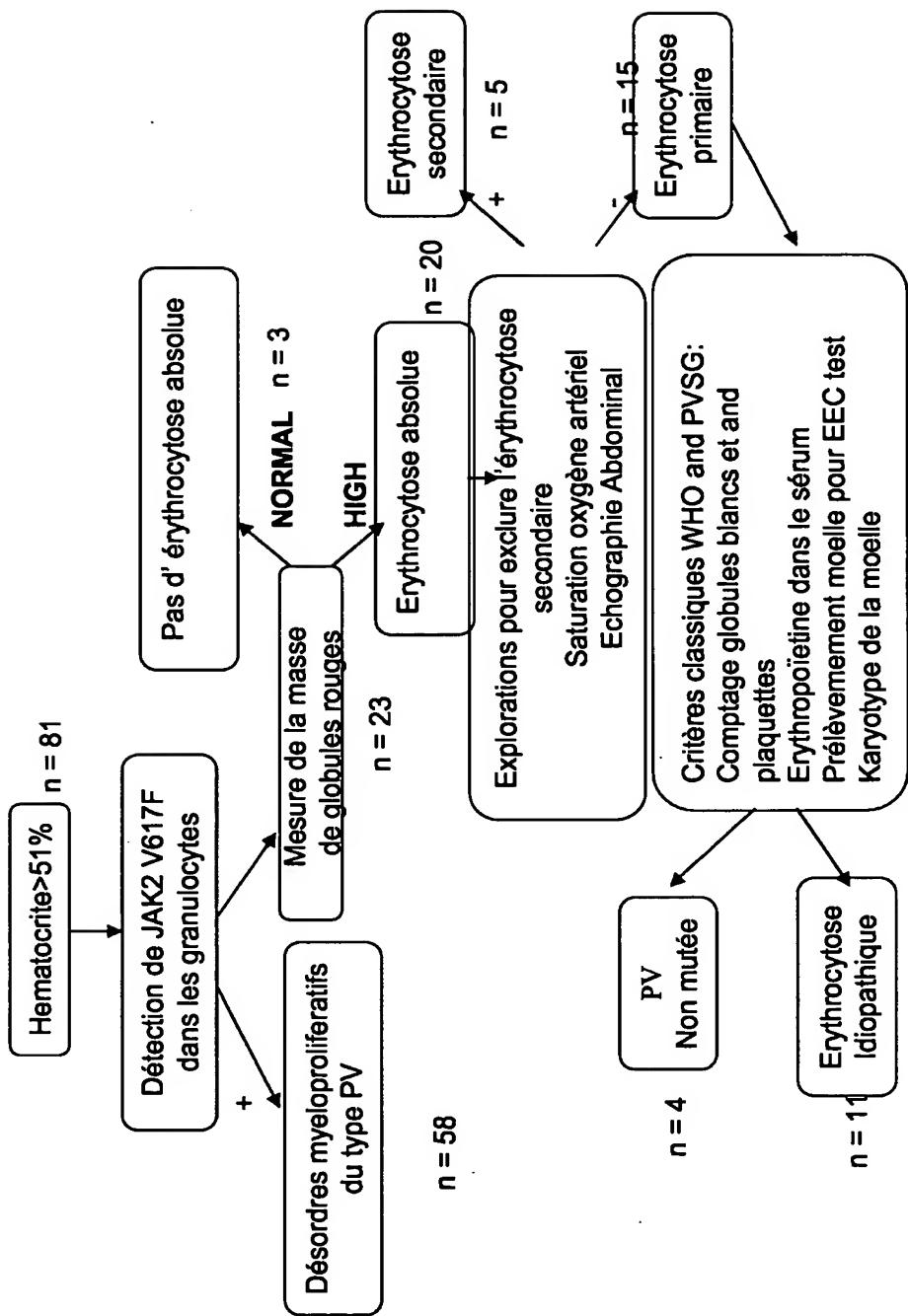


FIGURE 7

9 / 11

████████████████████ sequences for V617F JAK2 of the siRNA #1, 2 and 3

UGGAGUAUGUUCUGUGGA
GGAGUAUGUUCUGUGGAG
GAGUAUGUUCUGUGGAGA

Mutation

FIGURE 8

10 / 11

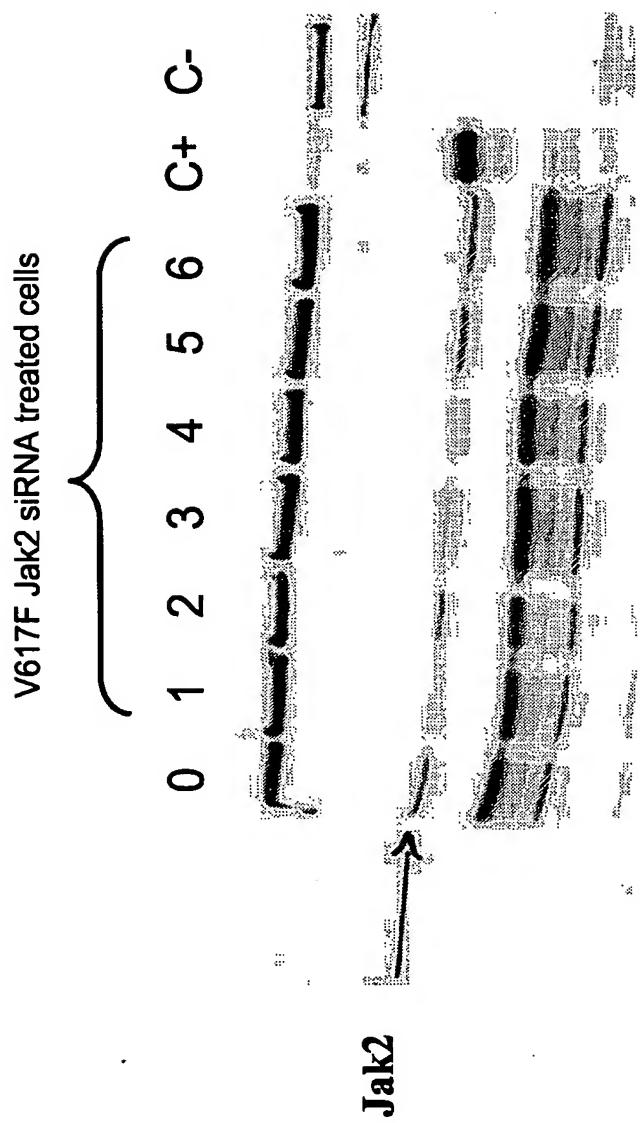
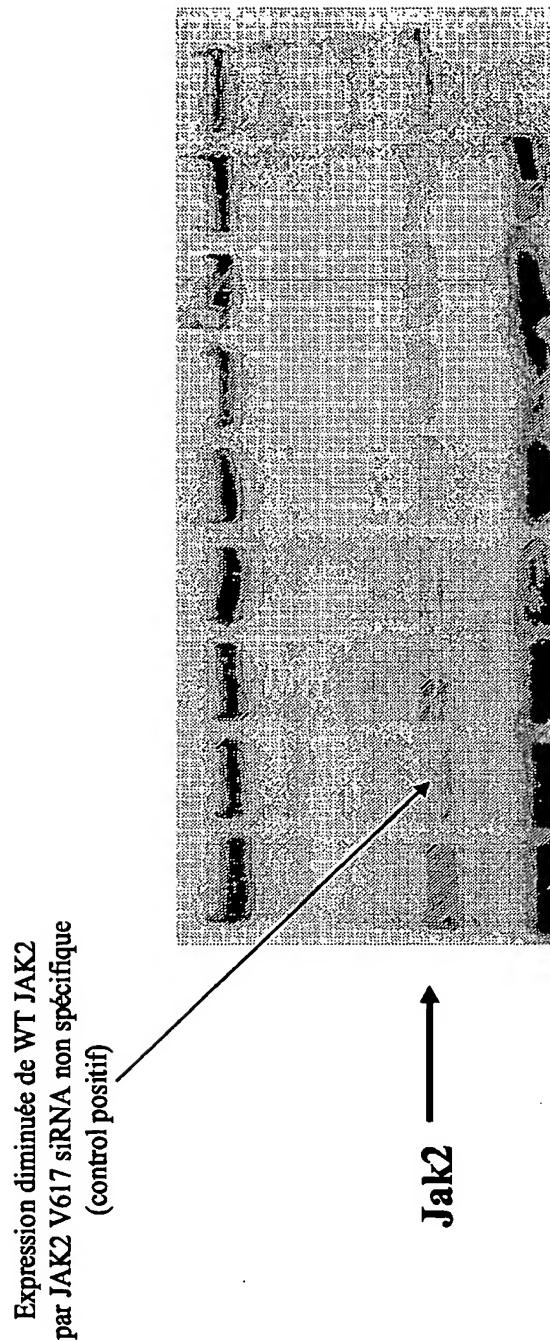


FIGURE 9

11 / 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/055586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N9/12 C12Q1/68 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>DATABASE UniProt 'Online' 7 June 2005 (2005-06-07), "Janus kinase 2." XP002369149 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q506Q0 Database accession no. Q506Q0 the whole document</p> <p>-----</p> <p>JAMES CHLOE ET AL: "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera" NATURE (LONDON), vol. 434, no. 7037, April 2005 (2005-04), pages 1144-1148, XP002369147 ISSN: 0028-0836 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-42
P, X		1-42

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search 22 February 2006	Date of mailing of the International search report 13/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Trommsdorff, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/055586

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>THE CANCER GENOME PROJECT BAXTER E J ET AL: "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 365, no. 9464, 19 March 2005 (2005-03-19), pages 1054-1061, XP004798459 ISSN: 0140-6736 the whole document</p> <p>-----</p>	1-42
A	<p>UGO V ET AL: "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 179-187, XP002324352 ISSN: 0301-472X the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>US 5 914 393 A (COLEMAN ET AL) 22 June 1999 (1999-06-22) the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>SALTZMAN ALAN ET AL: "Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: High mRNA expression in immune cells and muscle tissue" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, no. 3, 29 May 1998 (1998-05-29), pages 627-633, XP002324351 ISSN: 0006-291X the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>PAHL H L: "TOWARDS A MOLECULAR UNDERSTANDING OF POLYCYTHEMIA RUBRA VERA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 3395-3401, XP000982035 ISSN: 0014-2956 the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/055586

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see supplemental sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see supplemental sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.

PCT/EP2005/055586

Continuation of Box II.1

Although claims 10-21 relate to a diagnostic method practised on the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the product or composition.

Although claim 32 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the product or composition.

Continuation of Box II.2

Claims No.: -

The current claims 28, 30 and 39-42 relate to a compound characterised by a desirable attribute or property, namely its ability to reduce the expression of the JAK2 V617F variant. The claims encompass all the siRNAs that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (Article 612-6 of the French Intellectual Property Code) and/or adequate disclosure (Article 612-5 of the French Intellectual Property Code) for only a very limited number of such compounds. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Regardless of the above, the claims also lack clarity since they attempt to define the compound in terms of the result which is to be achieved. Again, this lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed only to the siRNAs defined in terms of their structure (see claims 29 and 31).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/055586

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5914393	A 22-06-1999	US 6019966 A	01-02-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/EP2005/055586

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 C12N9/12 C12Q1/68 G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>DATABASE UniProt 'Online! 7 juin 2005 (2005-06-07), "Janus kinase 2." XP002369149 extrait de EBI accession no. UNIPROT:Q506Q0 Database accession no. Q506Q0 le document en entier</p> <p>—</p>	1-42
P, X	<p>JAMES CHLOE ET AL: "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera" NATURE (LONDON), vol. 434, no. 7037, avril 2005 (2005-04), pages 1144-1148, XP002369147 ISSN: 0028-0836 le document en entier</p> <p>—</p> <p>—</p>	1-42

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 février 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/03/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Trommsdorff, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2005/055586

C(suite), DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	THE CANCER GENOME PROJECT BAXTER E J ET AL: "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 365, no. 9464, 19 mars 2005 (2005-03-19), pages 1054-1061, XP004798459 ISSN: 0140-6736 le document en entier	1-42
A	UGO V ET AL: "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 2, février 2004 (2004-02), pages 179-187, XP002324352 ISSN: 0301-472X le document en entier	
A	US 5 914 393 A (COLEMAN ET AL) 22 juin 1999 (1999-06-22) le document en entier	
A	SALTZMAN ALAN ET AL: "Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: High mRNA expression in immune cells and muscle tissue" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, no. 3, 29 mai 1998 (1998-05-29), pages 627-633, XP002324351 ISSN: 0006-291X le document en entier	
A	PAHL H L: "TOWARDS A MOLECULAR UNDERSTANDING OF POLYCYTHEMIA RUBRA VERA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, no. 12, juin 2000 (2000-06), pages 3395-3401, XP000982035 ISSN: 0014-2956 le document en entier	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALEDemande internationale n°
PCT/EP2005/055586**Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
2. Les revendications n°^s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
3. Les revendications n°^s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétendent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^s
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^s

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du dépose

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre II.1

Bien que les revendications 10-21 concernent une méthode de diagnostic appliquée au corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.

Bien que la revendication 32 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.

Suite du cadre II.2

Revendications nos.: -

Les revendications 28, 30, 39-42 présentes ont trait à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir sa capacité à diminuer l'expression du variant JAK2 V617F.

Les revendications couvrent tous les siRNA présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article L.612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI que pour un nombre très limité de tels composés.

Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative est impossible.

En conséquence, une recherche n'a été effectuée que pour les siRNAs définis de façon structurelle (voire revendications 29 et 31).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale n°

PCT/EP2005/055586

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5914393	A 22-06-1999 US	6019966 A	01-02-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.